

Aus der Klinik für
Innere Medizin und Kardiologie,
Deutsches Herzzentrum Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

**Die Bedeutung von
“Peroxisome Proliferator-Activated Receptors”
in der Pathogenese von Gefäßwandläsionen und
ihr Einfluß auf die Migration und Proliferation
vaskulärer Zellen**

Zur Erlangung der
venia legendi

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Stephan Götze
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J.W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Hecker, Göttingen
2. Prof. Dr. H. K. Kroemer, Greifswald

Datum der Einreichung: 23.09.2002

Datum der Habilitation: 25.03.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Eigene Arbeiten zur Expression und Funktion von PPARs in der Gefäßwand	3
2.1 Expression von PPARs in vaskulären und inflammatorischen Zellen, sowie in der pathologisch veränderten Gefäßwand.....	3
2.1.1 Vorkommen von PPARs in der Vaskulatur	3
2.1.2 PPAR-Liganden.....	4
2.1.3 Nachweis von biologisch aktivem PPAR γ in vaskulären Zellen.....	5
2.2 Hemmung der Migration vaskulärer und inflammatorischer Zellen durch PPARs	5
2.3 Migrationsmechanismen und Interaktion von PPARs mit der chemotaktischen Signaltransduktion	7
2.3.1 Migration und chemotaktisches Signaling vaskulärer und inflammatorischer Zellen	7
• Grundlagen der Zellmigration.....	7
• Mechanismen der chemotaktischen Signaltransduktion – Bedeutung der ERK1/2 MAPK.....	7
• Steuerung der Zellmotilität durch ERK1/2 MAPK und MLCK	8
• Regulation der Zellinvasion durch Matrix-Metalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren.....	9
• Chemotaktische Signalübertragung via PI3 Kinase / Akt / eNOS.....	11
2.3.2 Interaktion von PPARs mit Signalmolekülen der Migration	11
• Auswirkungen von PPARs auf den ERK1/2 MAPK Pathway.....	11
• Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren durch PPAR γ -Liganden	13
• PPARs hemmen die endotheliale Migration via Inhibition des Akt \rightarrow eNOS Signalwegs	16
2.4 Hemmung der Gefäßmuskelzellproliferation durch PPARs und ihre Effekte auf die ERK1/2 MAPK-abhängige mitogene Signaltransduktion	17
2.4.1 PPAR γ -Liganden hemmen die Gefäßmuskelzellproliferation	17
2.4.2 Bedeutung des ERK1/2 MAPK-Signalwegs in der Gefäßmuskelzellproliferation	18
2.4.3 Hemmung der ERK1/2 MAPK-vermittelten mitogenen Signaltransduktion durch PPAR γ	20
3. Zusammenfassung	21

1. Einführung

Atherosklerose und Restenose nach Ballonangioplastie werden heute als Gefäßwandveränderungen infolge inflammatorischer vaskulärer Antworten auf Verletzungsreize angesehen, die durch unterschiedliche Pathobiologien charakterisiert sind [1]. Die Atherosklerose ist eine zumeist chronisch entzündliche Gefäßerkrankung multifaktorieller Genese, bei der es durch lipidreiche Ablagerungen (Atheroma) und Bindegewebsveränderungen (Sklerose) zu einer Verdickung der Gefäßintima und schließlich zur Plaquebildung kommt [1, 2, 3]. Demgegenüber führt die Ballonangioplastie einer atherosklerotisch vorveränderten Gefäßwand oftmals zu einer raschen und charakteristischen "Response to Injury" Reaktion, die infolge einer massiven Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu einer Restenosierung des Gefäßlumens führen kann [1].

Atherosklerotische und restenotische Gefäßwandveränderungen resultieren aus sehr unterschiedlichen Interaktionen multipler Zelltypen und deren Signalkaskaden, die spezifische Gene, Proteine und Zellfunktionen regulieren. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Proliferation und Migration vaskulärer und inflammatorischer Zellen als Zellfunktionen von großer Bedeutung, da sie entscheidend zur Progression sowohl atherosklerotischer, als auch restenotischer Gefäßwandveränderungen beitragen [1].

Als Folge einer "Response to Injury" kommt es zu einer Freisetzung potenter Gefäßmuskelzellmitogene wie PDGF aus aggregierenden Thrombozyten, die eine überschießende Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bewirken [4]. Daneben ist PDGF einer der stärksten Migrationsfaktoren für Gefäßmuskelzellen und stimuliert durch die Synthese von Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Kollagen auch Veränderungen der extrazellulären Matrixstruktur der Gefäßwand [1]. Eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren und Zytokine die aus aggregierenden Thrombozyten (z.B. Thrombin), Leukozyten (z.B. $\text{TNF}\alpha$, Interleukine, Interferone) oder aus Zellen der Gefäßwand (z.B. Endothelin, FGF, IGF, AII) freigesetzt werden und ebenfalls auf die Migration und Proliferation von Gefäßmuskelzellen einwirken sind heute bekannt [1, 4]. Zusätzlich werden auch die Migration / Proliferation von Endothel- und inflammatorischen Zellen durch die freigesetzten Mediatoren reguliert. In atherosklerotischen Läsionen spielen diese Zellen durch eine gesteigerte Proliferation und Migration, sowie die Beeinflussung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix eine bedeutsame Rolle in der Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques [1].

Auch in Restenose-bedingten Gefäßläsionen ist die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen in Bezug auf die resultierende Lumenreduktion von entscheidender Bedeutung. Die proliferative Phase der Gefäßreparatur und Restenosierung erfolgt als meist überschießende Antwort auf die Verletzung, die konsekutive Entzündungsreaktion, die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung [4, 5]. Im ersten Stadium kommt es zu einem Abbau extrazellulärer Matrixproteine (ECM) durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) die von Gefäßmuskelzellen infolge Stimulation durch Wachstumsfaktoren und Zytokine sezerniert werden. Diese ECM-Degradation erlaubt den Gefäßmuskelzellen die Invasion und Durchquerung der Gefäßmedia und der Lamina elastica interna und somit eine Migration in die geschädigte Intima. Dort kommt es dann unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren und zusätzlichen Mediatoren zu einer gesteigerten Gefäßmuskelzell-Proliferation und de novo Synthese von ECM [1]. Wir konnten nachweisen, daß bei diesen Vorgängen, die durch komplexe intrazelluläre Signale vermittelt werden, die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen ERK1/2 eine Schlüsselrolle einnehmen, indem sie die Wirkung der Mitogene, Migrationsfaktoren und Zytokine in den Zellkern transduzieren und über Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie *Ets-1*, *Egr-1* und *c-fos* die Gen-Expression und / oder den Eintritt in den Zellzyklus bewirken [6, 7, 8].

Eine gezielte pharmakologische Intervention mit dem Ziel einer Inhibition der Migration und Proliferation vaskulärer und inflammatorischer Zellen stellt daher einen sinnvollen therapeutischen Ansatz zur Behandlung / Prävention atherosklerotischer und restenotischer Gefäßwandveränderungen dar. Grundlage einer solchen Pharmakotherapie ist die Kenntnis der an diesen Zellfunktionen beteiligten Signalübertragungsmechanismen und deren Interaktion mit potentiell gefäßprotektiven Substanzen. Dies wurde in den von uns durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen im Hinblick auf die Funktion von Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Matrix-Metalloproteinasen analysiert und deren Rolle in der Zellmigration und Proliferation charakterisiert.

Metabolische Störungen wie bei Diabetes und Dyslipidämie begünstigen die Entstehung und Progression von Gefäßwandläsionen und bedürfen als Hauptrisikofaktoren einer gezielten pharmakologischen Therapie. In den letzten Jahren haben Untersuchungen zu den antidiabetisch wirkenden Thiazolidindeonen und den lipidsenkenden Fibraten gezeigt, daß beiden Substanzgruppen neben ihren metabolischen Effekten auch gefäßprotektive Wirkungen durch Aktivierung der "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors" (PPARs) zukommen [9, 10, 11, 12]. Bei PPARs handelt es sich um Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren aus der Familie der nukleären Steroidrezeptoren, die in den Isoformen PPAR α und PPAR γ u.a. in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert werden und somit in allen wichtigen an Gefäßveränderungen beteiligten Zellen vorliegen. Fibrate agieren als Liganden für PPAR α , während PPAR γ durch die oralen Antidiabetika vom Typ der Thiazolidindeone aktiviert wird [9, 10, 11, 12]. Eigene Untersuchungen zu den an der Zellmigration und -Proliferation beteiligten Signalmolekülen wiesen eine durch PPAR-Liganden vermittelte Hemmung der chemotaktischen und der mitogenen Signalübertragung durch Inhibition der ERK1/2 MAPK-regulierten Transkriptionsfaktoren und deren downstream gelegenen Zielgenen nach [6, 8, 13, 14, 15]. In Endothelzellen konnten wir zudem eine Hemmung des für die Migration erforderlichen Phosphatidylinositol-3-Kinase \rightarrow Akt \rightarrow eNOS Pathways durch PPAR-Liganden aufzeigen [16, 17].

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten stellen diese Untersuchungsergebnisse zu den Auswirkungen von PPAR-Liganden auf die Migration und Proliferation vaskulärer und inflammatorischer Zellen und die beteiligten Signaltransduktionsmechanismen vor.

2. Eigene Arbeiten zur Expression und Funktion von PPARs in der Gefäßwand

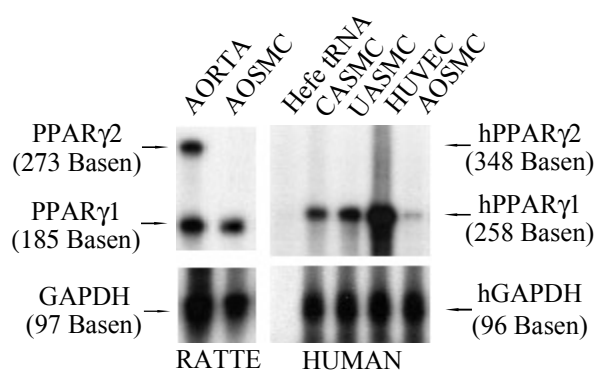
2.1 Expression von PPARs in vaskulären und inflammatorischen Zellen, sowie in der pathologisch veränderten Gefäßwand

2.1.1 Vorkommen von PPARs in der Vaskulatur

Peroxisome Proliferator Activated-Receptors (PPARs) sind eine Gruppe nukleärer Rezeptoren die durch Liganden aktiviert werden und zur Familie der Steroid Hormon-Rezeptoren gehören [9, 10, 11, 12]. Die Namensgebung der PPARs ist abgeleitet von der ursprünglichen Beobachtung einer Proliferation hepatozellulärer Peroxisomen nach Behandlung mit PPAR-Liganden wie z.B. Fibraten, die jedoch nur bei Nagetieren auftreten. Aus der Gruppe der PPARs sind die Subtypen PPAR α , PPAR γ und PPAR δ (syn. PPAR β) bekannt, jedoch konnten bislang nur für die α - und die γ -Form funktionelle Bedeutungen nachgewiesen werden [9, 10, 11, 12]. PPAR α wird insbesondere in der Leber exprimiert, während PPAR γ überwiegend im Fettgewebe vorliegt. Beide, PPAR α und γ , sind jedoch auch in vielen anderen Zelltypen und Geweben nachweisbar [9, 10, 11, 12].

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß PPAR γ sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Endothelzellen vorkommt [15]. Hierzu führten wir RNase Protection Assays und Western-Blot Analysen durch, mit deren Hilfe wir in menschlichen Koronargefäßmuskelzellen, aortalen Rattengefäßmuskelzellen und humanen Endothelzellen die Expression von mRNA und auch von nukleären Rezeptoren für PPAR γ 1 nachwies. Vergleichbare Beobachtungen zur Expression von PPAR γ in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und auch in Monozyten/Makrophagen wurden auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen gemacht [18, 19, 20, 21]. Durch immunhistochemische Untersuchungen an menschlichen und Rattenarterien konnten wir zudem das *in vivo* Vorkommen von PPAR γ demonstrieren. Dabei zeigte sich eine deutlich gesteigerte PPAR γ -Expression in der hyperplastischen Neointima der Rattenaorta 7 und 14 Tage nach Ballonangioplastie. Und auch in humanen Koronararterien fanden wir eine vermehrte Anreicherung von PPAR γ in Gefäßmuskelzellen früher atheromatöser Gefäßwandveränderungen und ihrer Vorläuferstadien (Abbildung 1-2).

Abb. 1(A)



(B)

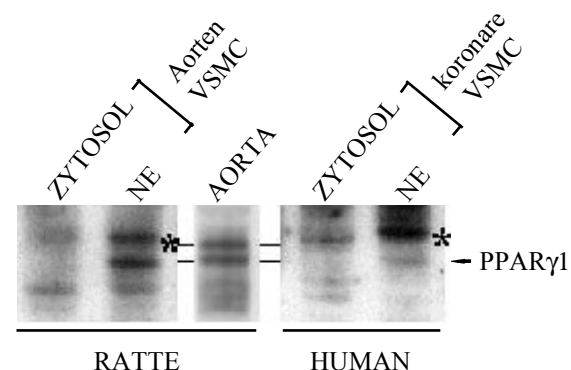


Abb. 1: PPAR γ wird in vaskulären Zellen exprimiert. (A) Nachweis von PPAR γ 1 mRNA in glatten Gefäßmuskelzellen (AOSMC, CASC, UASC) und Endothelzellen (HUVEC) mittels RNase-Protection Assays (GAPDH dient als interne Kontrolle). (B) Western Blots weisen das Vorliegen von PPAR γ 1 Protein im Zellkern glatter Gefäßmuskelzellen nach (NE: Nukleäre Extrakte, *: Artefakt-Bande) [15].

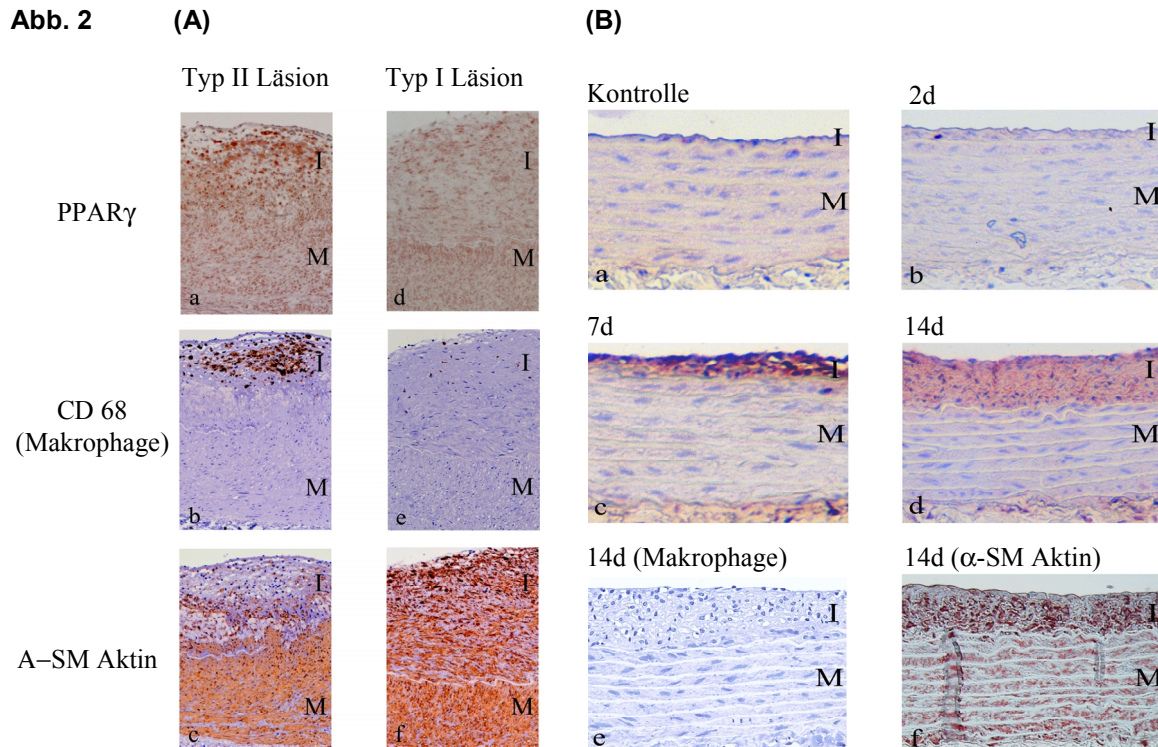


Abb. 2: Immunhistochemischer Nachweis von PPAR γ in vaskulären Läsionen. (A) In humanen atherosklerotischen Läsionen liegt PPAR γ in Gefäßmuskelzellen und Makrophagen vor (Typ I: Precursor-Läsion, Typ II, frühes Atherom). (B) Nach Ballonangioplastie wird PPAR γ vermehrt in aortalen Ratten-Gefäßmuskelzellen der hyperplastischen Intima exprimiert. (I = Intima; M = Media; d = Tage nach Ballonangioplastie; Kolokalisationsfärbungen mit CD68 als Makrophagen-Marker oder α -Smooth Muscle Aktin für Gefäßmuskelzellen) [15].

Unsere und verschiedene andere Arbeitsgruppen haben zudem gezeigt, daß auch PPAR α , ähnlich wie PPAR γ , ebenfalls in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Monozyten *in vitro* und *in vivo* exprimiert wird und beide PPARs in diesen Zellen funktionell wirksam sind [18, 22].

2.1.2 PPAR-Liganden

Aktiviert werden PPARs durch spezifische Liganden, von denen eine Reihe endogener und synthetischer Formen bekannt sind. PPAR α wird durch endogene Liganden wie Fettsäuren (Palmitin- und Arachidonsäure) und einige Eicosanoide (Hydroxyeicosatetraenoic acid = 8(S)-HETE) aktiviert [23]. Hochaffine synthetische PPAR α -Liganden stellen die lipidsenkenden Fibrate (Fenofibrat, Clofibrat, WY-14,643 u.a.) dar [24], die in der Klinik zur Therapie von Hyperlipoproteinämien eingesetzt werden. Als endogene Liganden für PPAR γ agieren die oxidierten Fettsäuren 9(S)-HODE und 13(S)-HODE (Hydroxyoctadecadienoic acid) und das Prostaglandinderivat 15-deoxy- $\Delta^{2,14}$ -Prostaglandin J₂ (PGJ₂) [25, 26]. Insulin-Sensitizer vom Typ der Thiazolidindione (TZD, z.B. Troglitazon, Rosiglitazon, Ciglitazon u.a.), die klinische Anwendung in der Behandlung des Typ 2 Diabetes finden, wurden als potente synthetische PPAR γ -Liganden identifiziert [27].

In ihrer biochemischen Struktur besitzen PPARs ähnlich wie andere nukleäre Hormonrezeptoren eine Ligand-bindende und eine DNA-bindende Domäne (DBD). Nach Aktivierung der PPARs durch ihre Liganden bilden diese funktionell aktive Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Diese PPAR / RXR-Heterodimere binden über die DBD an spezifische DNA-Fragmente, die sogenannten PPAR Response Elements (PPRE) in der Promotorregion bestimmter Zielgene und regulieren dadurch deren Transkription (Abbildung 3) [28]. Weiterhin können PPARs die Transkription spezifischer

Gene durch inhibitorische Interaktion mit Signalkaskaden wie dem ERK1/2 MAPK Pathway, sowie anderen Transkriptionsfaktoren modulieren [9, 10, 11, 12].

Abb. 3:

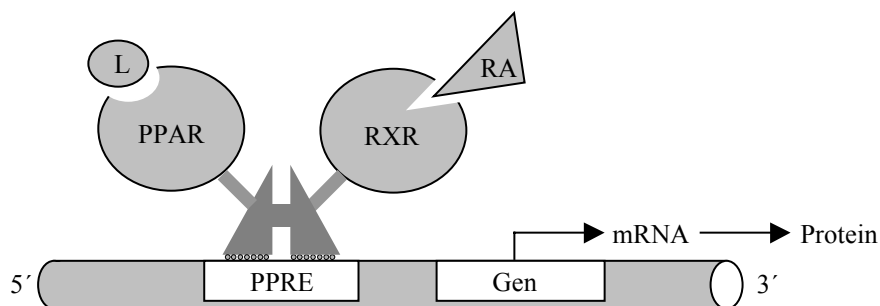


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genregulation durch PPARs. (L: PPAR-Ligand; RA: Retinoic Acid = RXR-aktivierender Ligand; PPRE: PPAR Response Element, modifiziert nach [29])

2.1.3 Nachweis von biologisch aktivem PPAR γ in vaskulären Zellen

Um eine mögliche biologische Relevanz des von uns in vaskulären Zellen nachgewiesenen PPAR γ nachzuweisen, untersuchten wir in Transfektionsexperimenten ob bekannte PPAR γ -Liganden wie TZD und PGJ2 auch in Gefäßmuskelzellen zu einer Aktivierung von PPAR γ führen. Hierzu unterzogen wir Rattengefäßmuskelzellen einer transienten Transfektion mit einem PPAR Response Element Reporter Plasmid (PPRE-CAT). Dabei beobachteten wir eine Aktivierung des PPRE-CAT durch endogenes PPAR γ nach dessen Aktivierung durch seine Liganden PGJ2 und die TZD Troglitazon und Rosiglitazon, was auf eine funktionelle Bedeutung von PPAR γ in der Gefäßwand hindeutet.

Durch den Nachweis der Expression biologisch aktiver PPARs in vaskulären und inflammatorischen Zellen haben sich in den vergangenen Jahren eine Reihe höchst interessanter Konzepte zur pharmakologischen Behandlung metabolischer Risikofaktoren und gleichzeitiger Prävention / Therapie kardiovaskulärer Komplikationen entwickelt. Denn nachdem PPARs initial vor allem durch ihre Auswirkungen auf metabolische Vorgänge von klinischer Bedeutung zu sein schienen, indem sie als Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener am Lipid- und Glukosestoffwechsel beteiligter Gene regulieren, belegen neuere Untersuchungen zusätzliche Effekte der PPARs auf das kardiovaskuläre System und daran beteiligter migratorischer, proliferativer und inflammatorischer Prozesse [9, 10, 11, 12].

2.2 Hemmung der Migration vaskulärer und inflammatorischer Zellen durch PPARs

In einer frühen Studie war von Ronald Law und seiner Arbeitsgruppe bereits gezeigt worden, daß Troglitazon die Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie der Rattenaorta hemmt [30]. Troglitazon, ein Thiazolidindeon, agiert als Ligand für PPAR γ , welches wir als biologisch aktiven nukleären Rezeptor in vaskulären Zellen nachgewiesen haben. Basierend auf diesen bisherigen Ergebnissen ließ sich vermuten, daß PPAR γ das eigentliche intrazelluläre Ziel von TZD in vaskulären Zellen darstellt und für die negative Wachstumsregulation nach Angioplastie verantwortlich ist. In den folgenden Arbeiten untersuchten wir deshalb die durch PPAR γ regulierten Zellfunktionen und die beteiligten zellulären Zielstrukturen. Dabei galt das Interesse insbesondere den Auswirkungen von PPAR γ auf die Migration und Proliferation vaskulärer Zellen.

In Untersuchungen an humanen und Rattengefäßmuskelzellen konnten wir eine Hemmung der chemotaktischen Antwort auf den potenten Migrationsfaktor PDGF sowohl durch die TZD-PPAR γ -Liganden Troglitazon, Rosiglitazon, als auch den physiologischen PPAR γ -Liganden PGJ2 nachweisen

(Abbildung 4) [15]. Um zu überprüfen, ob diese migrationshemmende Wirkung der PPAR γ -Liganden auch auf andere Chemotaxine zutrifft, untersuchten wir deren Effekte auf die durch Thrombin, TNF α und IGF-1 ausgelöste Migration von Rattengefäßmuskelzellen. Dabei hemmten alle 3 PPAR γ -Liganden die durch jedes der Chemotaxine induzierte Migration in konzentrationsabhängiger Weise [13] [31]. Diese Ergebnisse wurden durch vergleichbare Beobachtungen von Marx *et al.* bestätigt [18].

Abb. 4:

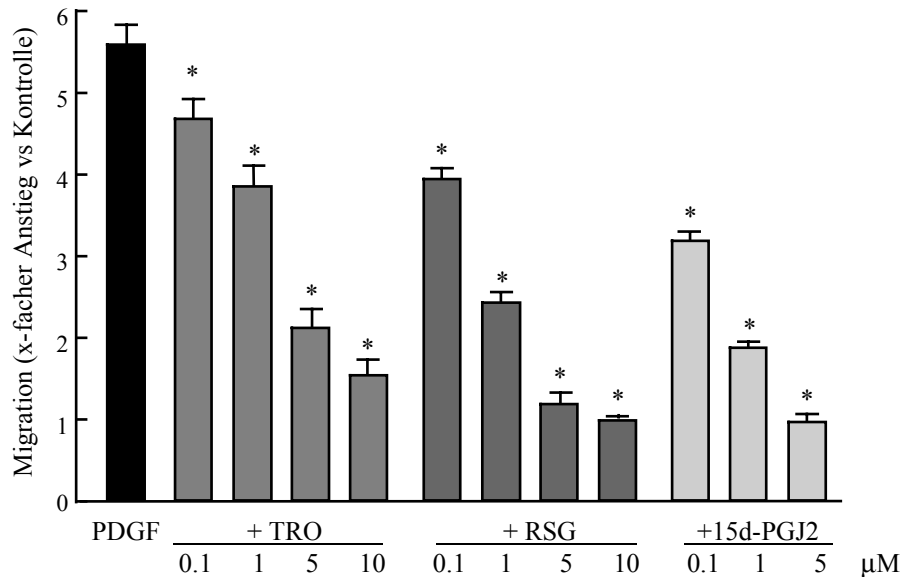


Abb. 4: PPAR γ -Liganden hemmen die PDGF-induzierte Gefäßmuskelzell-Migration. (Migrations-experimente mit aortalen Ratten-Gefäßmuskelzellen; PPAR γ -Liganden = TRO, RSG, 15d-PGJ2; Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n= 6; * p < 0.05 vs. PDGF allein) [15].

Die durch verschiedene Migrationsfaktoren stimulierte Migration humaner Endothelzellen und von Monozyten wird ebenfalls durch die o.g. PPAR γ -Liganden potent gehemmt [16, 17, 32]. Darüberhinaus konnten wir auch eine ausgeprägte migrationshemmende Wirkung von PPAR α -Liganden vom Typ der Fibrate in Endothelzellen und Monozyten nachweisen (Abbildung 5) [17], wohingegen PPAR α -aktivierende Liganden in Gefäßmuskelzellen interessanterweise keinen Einfluß auf die Migration haben [18, 33].

Zum besseren Verständnis der migrationshemmenden Wirkungen der PPARs folgten Untersuchungen zu den Migrationsmechanismen vaskulärer und inflammatorischer Zellen und den Interaktionen von PPARs mit der chemotaktischen Signaltransduktion.

Abb. 5:

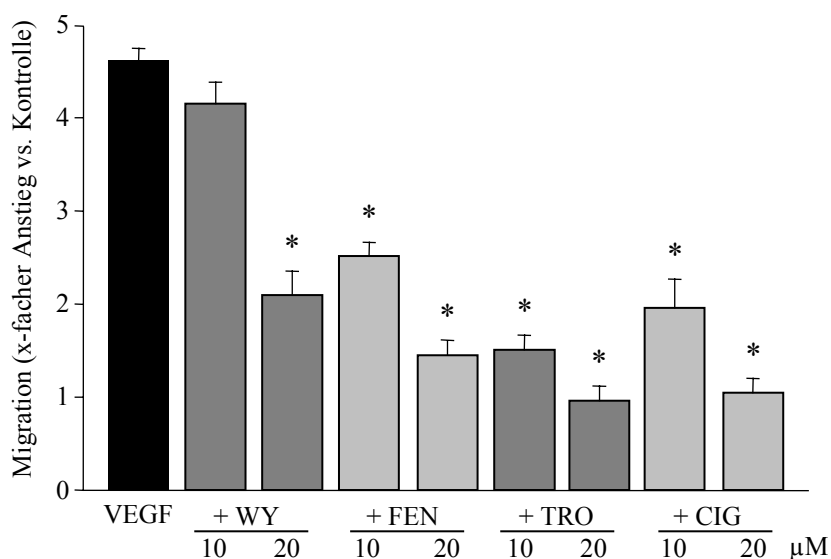


Abb. 5: Die Migration humaner Endothelzellen wird durch PPAR α - und γ -Liganden gehemmt. (VEGF dient als Migrationsfaktor für HUVEC, PPAR α -Liganden = WY, FEN; PPAR γ -Liganden = TRO, CIG; Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n= 4; * p < 0.05 vs. VEGF allein) [17].

2.3 Migrationsmechanismen und Interaktion von PPARs mit der chemotaktischen Signaltransduktion

2.3.1 Migration und chemotaktisches Signaling vaskulärer und inflammatorischer Zellen

Grundlagen der Zellmigration

Die Migration vaskulärer und inflammatorischer Zellen ist eine komplexe zelluläre Antwort auf Chemotaxine, die durch Thrombozyten, Makrophagen / Monozyten, Endothelzellen oder Gefäßmuskelzellen freigesetzt werden und auf die veränderte Vaskulatur wirken [5]. Damit Zellen migrieren können, muß sowohl deren Adhäsion / Deadhäsion an der extrazellulären Matrix oder benachbarten Zellen gewährleistet sein, als auch eine Steigerung der Zellmotilität, eine gerichtete Chemotaxis und die Gewebsinvasion durch Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix erfolgen [34, 35]. In den vergangenen Jahren konnten eine Vielzahl migrationsregulierender Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen in der Vaskulatur nachgewiesen werden, jedoch war noch immer wenig über die intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen bekannt, die die Zellmigration steuern.

Mechanismen der chemotaktischen Signaltransduktion – Bedeutung der ERK1/2 MAPK

In vorangegangenen Studien war gezeigt worden, daß bei diesen chemotaktischen Signalkaskaden den Mitogen-Aktivierten Protein Kinasen ERK1/2 (ERK1/2 MAPK) eine entscheidende Rolle zukommt und die PDGF-vermittelte Gefäßmuskelzellmigration durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK-Kinase Inhibitor PD98059 gehemmt werden kann [36, 37].

In weiterführenden Arbeiten konnten wir mithilfe pharmakologischer Inhibitoren und Antisense-Oligodesoxynukleotiden zeigen, daß die Migration von Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Monozyten auch nach Stimulation mit anderen vasoaktiven Faktoren abhängig von der Aktivierung der ERK1/2 MAPK ist [8, 13, 17, 31, 32, 38]. Dies bedeutet, daß die ERK1/2 MAPK einem intrazellulären Knotenpunkt konvergierender migratorischer Signale entspricht, der die chemotaktische Signalübertragung in diesen Zellen ausgehend von so unterschiedlichen Zelloberflächenrezeptoren wie G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Angiotensin II, Thrombin) [13, 38], Tyrosin-Kinase Rezeptoren (PDGF, IGF-1, VEGF) [8, 13, 17], endothelialen Leptin-Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren (TNF α , CRP, MCP-1) [31, 32] vermittelt.

Steuerung der Zellmotilität durch ERK1/2 MAPK und MLCK

Die besondere Bedeutung der ERK1/2 MAPK bei der Zellmigration läßt sich vermutlich darauf zurückführen, daß sie sowohl zytosolische, als auch nukleäre Faktoren nach ihrer Translokation in den Zellkern reguliert [39, 40, 41]. Wir untersuchten daher zunächst mögliche zytosolische, ERK1/2-abhängig regulierte Signalmoleküle, die an der Migration beteiligt sind. Die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) ist ein durch Phosphorylierung aktiviertes zytosolisches Protein, das durch Phosphorylierung der leichten Myosinketten (Myosin Light Chain, MLC) an der Steuerung der Zell-Kontraktilität und Zell-Motilität beteiligt ist [39]. Wir konnten nachweisen, daß Migrationsfaktoren wie PDGF in Gefäßmuskelzellen eine ERK1/2 MAPK-abhängige, transiente Phosphorylierung der MLCK induzieren [8], was mit Berichten über eine Regulation der MLCK-Aktivität durch ERK1/2 MAPK in verschiedenen Tumorzelllinien übereinstimmt (Abbildung 7) [39, 42].

Die Bedeutung der MLCK in der chemotaktischen Signaltransduktion von Gefäßmuskelzellen konnten wir anhand von Migrationsexperimenten nachweisen, in denen sich die PDGF-stimulierte Gefäßmuskelzellmigration durch den spezifischen MLCK-Inhibitor ML9 dosisabhängig hemmen ließ (Abbildung 6) [8]. Vergleichbare Ergebnisse einer Migrationshemmung durch ML9 erhoben wir auch in Endothelzellen. Im Gegensatz zur Zellmotilität fanden wir in unseren Untersuchungen keinen Hinweis für eine Beteiligung der ERK1/2 MAPK an der Adhäsion vaskulärer oder Entzündungszellen an verschiedenen Matrices [8].

Abb. 6:

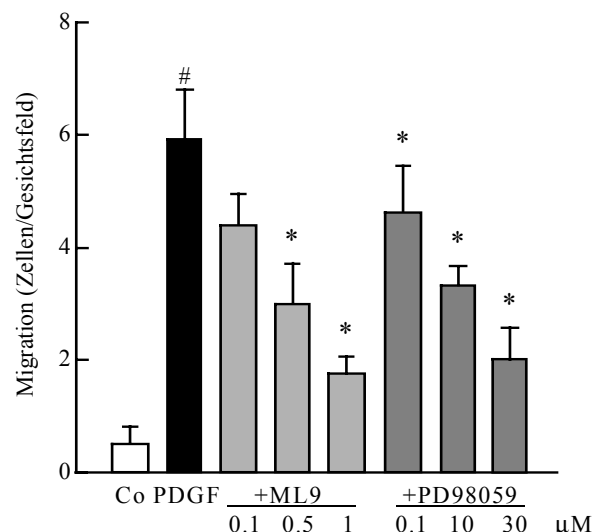


Abb. 6: Die Gefäßmuskelzellmigration ist ERK1/2 MAPK- und MLCK-abhängig. Hemmung der PDGF-stimulierten Migration aortaler Rattengefäßmuskelzellen durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK-Pathway Inhibitor PD98059 und den MLCK-Inhibitor ML9. (Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n= 3; * p < 0.05 vs. PDGF allein) [8].

Regulation der Zellinvasion durch Matrix-Metalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren

Neben der Regulation zytosolischer Kinasen spielt die ERK1/2 MAPK eine wichtige Rolle in der Steuerung nukleärer Ereignisse, da sie durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen reguliert, die ihrerseits das Zellverhalten modulieren. Die Beteiligung nukleärer Signalereignisse an der Zellmigration wird durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegt, die zeigen, daß die Migration von Gefäßmuskelzellen *in vitro* durch Inhibitoren der Transkription und Translation gehemmt werden kann [13]. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein, die aufzeigten, daß die invasive Komponente der Zellmigration von der *de novo* Synthese und Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) abhängt [43, 44]. MMPs führen zu einem Abbau extrazellulärer Matrixproteine und erlauben dadurch den vaskulären und inflammatorischen Zellen eine Invasion und Gewebsdurchquerung [5, 35]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten führten wir daher Experimente an Gefäßmuskelzellen und Monozyten durch, in denen wir nachweisen konnten, daß die Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-9 ERK1/2 MAPK-abhängig reguliert wird [32] (Abbildung 7). Vergleichbare Ergebnisse liegen auch aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Gefäßmuskelzellen vor [18]. Aus diesen Zusammenhängen entwickelten wir die Arbeitshypothese, daß die ERK1/2 MAPK möglicherweise als intrazellulärer Verzweigungspunkt chemotaktischer Signale agiert, indem sie einerseits die zytosolische Motilitätsmaschinerie via MLCK aktiviert und andererseits über die Regulation nukleärer Faktoren die MMP-Synthese und damit die Zellinvasion steuert. Wir untersuchten daraufhin die Rolle der ERK1/2 MAPK bei der durch Chemotaxine induzierten Expression und Regulation der Transkriptionsfaktoren *Ets-1*, *c-fos* und *Egr-1*. Diese Transkriptionsfaktoren sind für die Zellmigration von Bedeutung, da die Promoterregionen verschiedener, pathophysiologisch relevanter Matrixmetalloproteinasen "Nucleotide Recognition Elements" für *Ets-1*, *c-fos* und *Egr-1* beinhalten [45, 46]. In diesem Zusammenhang hatten Santiago *et al.* gezeigt, daß eine *Egr-1* Depletion glatter Gefäßmuskelzellen deren Migration *in vitro* und die Neointimabildung nach Angioplastie *in vivo* hemmt [47]; und in Endothelzellen konnten Iwasaka und Kollegen durch *Ets-1* Antisense Oligodesoxynucleotide sowohl die Migration als auch die Angiogenese inhibieren [48]. In Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen konnten wir nun nachweisen, daß die durch Migrationsfaktoren (PDGF-BB, $\text{TNF}\alpha$) induzierte Expression von *Ets-1*, *c-fos* und *Egr-1* in beiden Zelltypen durch ERK1/2 MAPK vermittelt wird (Abbildung 8) [7, 8]. Weiterhin konnten wir zeigen, daß in verschiedenen Formen pathologisch veränderter Gefäße (atherosklerotischen Läsionen LDL-Rezeptor defizienter Mäuse und hyperplastisch-neointimalen Läsionen der Rattenaorta nach Ballonangioplastie) die aktivierte Form der ERK1/2 MAPK und die Transkriptionsfaktoren *Ets-1*, *c-fos* und *Egr-1* innerhalb der Läsionen vermehrt kolokalisiert nachweisbar sind (Abbildung 9) [7].

Abb. 7:

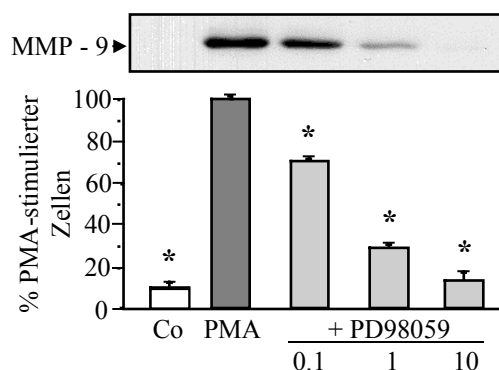


Abb. 7: Die durch PMA induzierbare MMP-9 Expression ist ERK1/2-abhängig und wird durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK-Pathway Inhibitor PD98059 gehemmt. Repräsentativer Western Blot von Gesamtzelllysaten humaner THP-1 Monozyten mit densitometrischer Analyse. (Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n = 3; * p < 0.05 vs. PMA allein) [32].

Abb. 8:

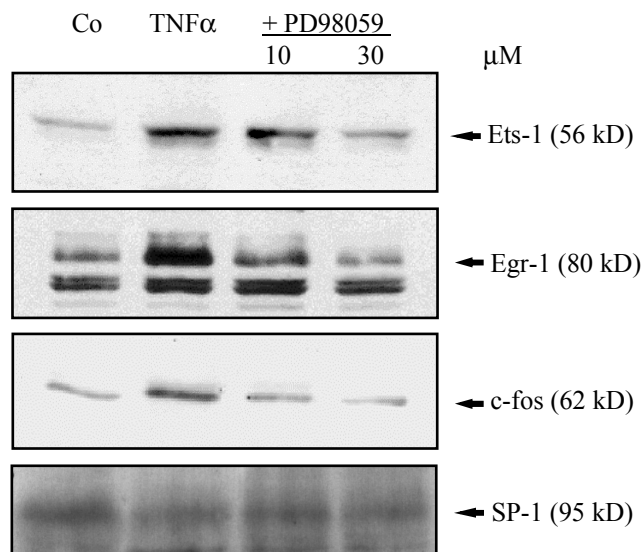


Abb. 8: Die TNF α stimulierte Expression der Transkriptionsfaktoren Ets-1, Egr-1 und c-fos ist ERK1/2 MAPK-abhängig und wird durch den ERK1/2 MAPK-Pathway Inhibitor PD98059 gehemmt. (Western Blot-Untersuchungen aortaler Rattengefäßmuskelzellen; der Transkriptionsfaktor SP-1 dient als interne Kontrolle, da er nicht durch TNF α oder ERK1/2 MAPK reguliert wird) [7].

Abb. 9:

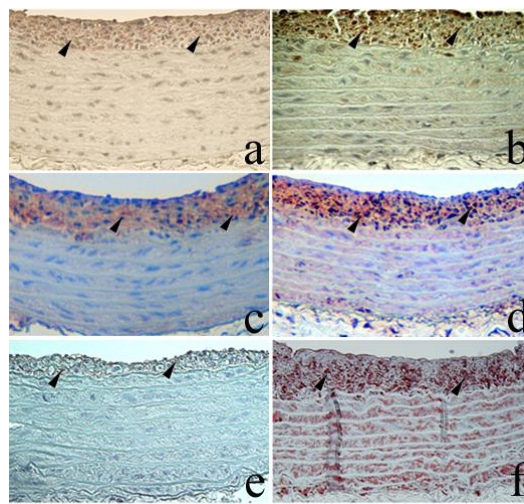


Abb. 9: In der hyperplastischen Intima der Rattenaorta sind 2 Wochen nach Ballonangioplastie TNF α (a), die Transkriptionsfaktoren Ets-1 (b), Egr-1 (c) und c-fos (d), sowie aktivierte, phosphorylierte ERK1/2 MAPK (e) immunhistochemisch vermehrt in Gefäßmuskelzellen nachweisbar (Pfeile). Charakteristische Anfärbung der Läsion mit α -Smooth Muscle Aktin als Marker glatter Gefäßmuskelzellen (f) [7].

Chemotaktische Signalübertragung via PI3 Kinase / Akt / eNOS

Als weiterer, insbesondere für die Endothelzellmigration wichtiger Signalweg wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen der ERK1/2 MAPK-unabhängige Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / Akt / eNOS Pathway beschrieben, der die Zellmotilität durch Reorganisation des Aktin / Myosin Zytoskeletts ermöglicht [49, 50, 51]. Im Rahmen unserer Untersuchungen an Endothelzellen konnten wir erstmalig nachweisen, daß neben dem bekannten Migrationsfaktor VEGF auch das Peptidhormon Leptin und der Entzündungsmediator CRP (C-reaktives Protein) durch Aktivierung der PI3K und der Proteinkinase Akt die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase und die Endothelzellmigration stimulieren (Abbildung 10) [16, 17].

Abb. 10:

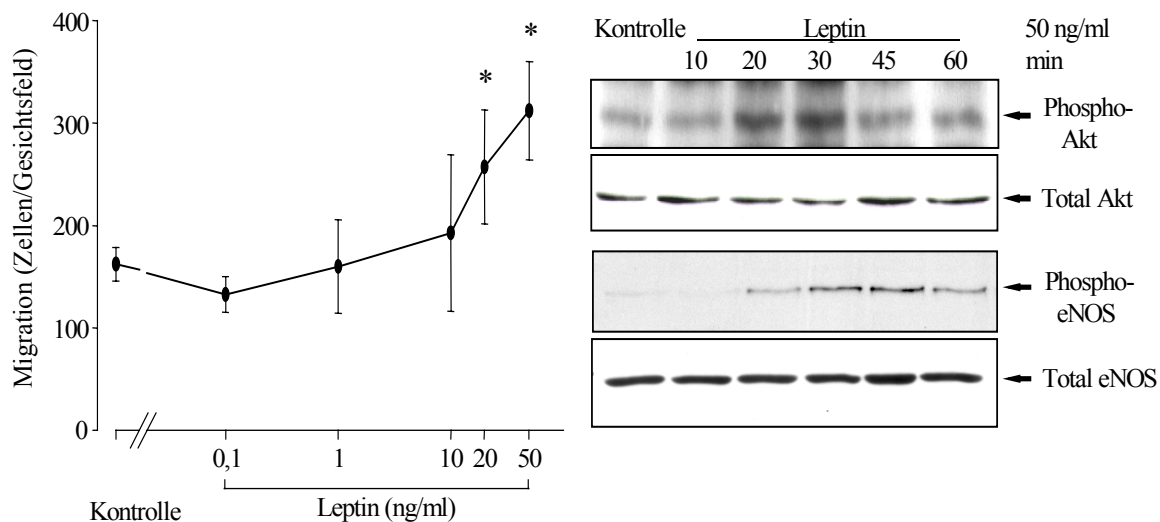


Abb. 10: Leptin stimuliert die Migration (A) und Phosphorylierung von Akt und eNOS (B) in humanen Endothelzellen (HUVEC). (A: Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n = 3; * p < 0.05 vs. unstimulierter Kontrolle; B: Western Blot Analyse mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen Akt und eNOS) [16].

2.3.2 Interaktion von PPARs mit Signalmolekülen der Migration

Auswirkungen von PPARs auf den ERK1/2 MAPK Pathway

Da nach unseren Untersuchungen der ERK1/2 MAPK eine Schlüsselrolle in der Zellmigration zukommt, überprüften wir zunächst, ob die migrationshemmende Wirkung der PPAR-Liganden auf einer Inhibition der zytosolischen Aktivierung von ERK1/2 MAPK beruht. Hierzu konnten wir zeigen, daß keiner der von uns getesteten PPAR α - oder PPAR γ -Liganden die durch verschiedene Chemotaxine induzierte zytosolische ERK1/2 MAPK-Aktivität in vaskulären und inflammatorischen Zellen hemmt (Abbildung 11) [13, 17, 31, 32]. Dies wies auf eine Hemmung der chemotaktischen Signaltransduktion durch PPAR-Liganden an einem Punkt distal der ERK1/2 MAPK hin, der möglicherweise auf nukleärer Ebene liegt.

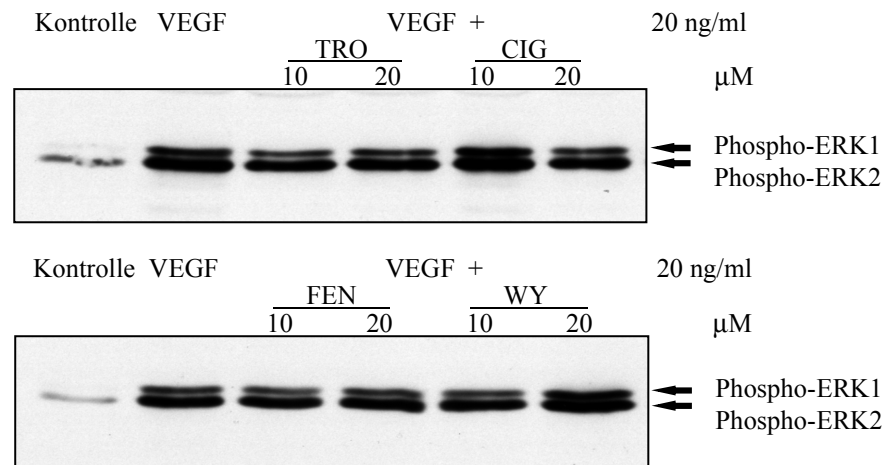
Abb. 11:

Abb. 11: Die Phosphorylierung und Aktivierung der ERK1/2 MAPK wird nicht durch PPAR α - oder γ -Liganden beeinflusst. Western Blot Untersuchung VEGF-stimulierter Endothelzellen (HUVEC) mithilfe phospho-spezifischer ERK1/2 MAPK Antikörper. Behandlung mit den PPAR γ -Liganden TRO / CIG oder den PPAR α -Liganden FEN / WY wie dargestellt [17].

Es ist gezeigt worden, daß PPAR γ -Liganden in Makrophagen die Zytokin-induzierte Expression der NO-Synthase und der Gelatinase B durch Transrepression der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 hemmen [52]. Es ist weiterhin bekannt, daß die ERK1/2 MAPK nach ihrer zytosolischen Aktivierung in den Nukleus transloziert, wo sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert die wiederum das Zellverhalten modulieren [53]. Eine PPAR γ -vermittelte Transrepression von ERK1/2 MAPK-regulierten Transkriptionsfaktoren oder eine PPAR γ -assoziierte Hemmung der nukleären ERK1/2 MAPK Translokation könnten somit mögliche Mechanismen für die antimigratorische Wirkung der PPAR γ -Liganden in Gefäßmuskelzellen darstellen.

Da wir zeigen konnten, daß die chemotaktische Wirkung von Angiotensin II in Gefäßmuskelzellen ERK1/2 MAPK-abhängig ist [38], untersuchten wir in einer weiteren Arbeit den Effekt des PPAR γ -Liganden Troglitazon auf die Angiotensin II-vermittelte ERK1/2 MAPK Translokation in den Zellkern. Die zytosolische Aktivierung der ERK1/2 MAPK durch Angiotensin II in Gefäßmuskelzellen erfolgt durch Signaltransduktion via PKC ζ \rightarrow MEK \rightarrow ERK1/2 MAPK [54]. Durch Untersuchungen mit Immun-Komplex-Phosphorylierungs-Assays und Western-Blot Analysen konnten wir nachweisen, daß weder die Angiotensin II-stimulierte zytosolische PKC ζ -Aktivität, noch die konsekutive ERK1/2 MAPK Phosphorylierung durch den PPAR γ -Liganden Troglitazon gehemmt wird [6]. Demgegenüber führte Troglitazon zu einer signifikanten Hemmung der Angiotensin II-induzierten Translokation von ERK1/2 MAPK in den Zellkern und auch seiner nukleären Aktivität (Abbildung 12) [6]. Da PPAR γ überwiegend im Zellkern lokalisiert ist, resultieren diese Ergebnisse vermutlich aus einer inhibitorischen Interaktion von Ligand-aktiviertem PPAR γ mit ERK1/2 MAPK und erklären einen Teil der migrationshemmenden Effekte der PPAR γ -Liganden.

Abb. 12:

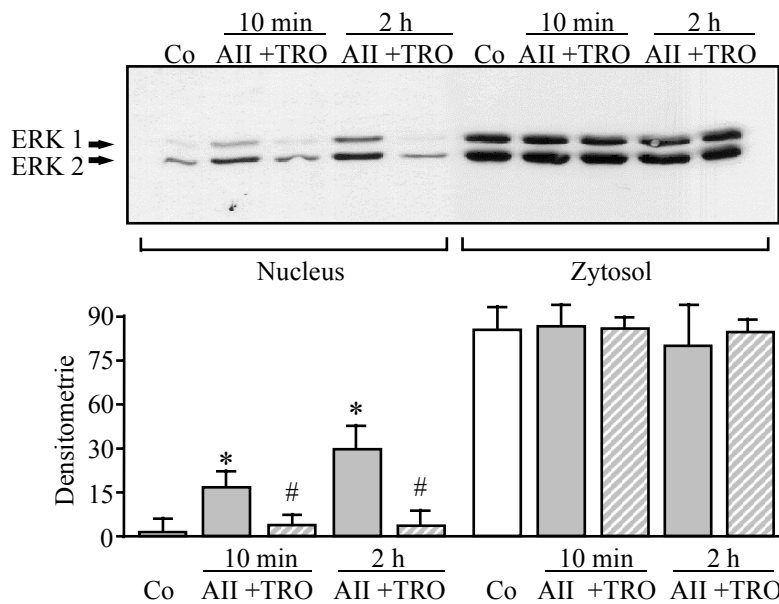


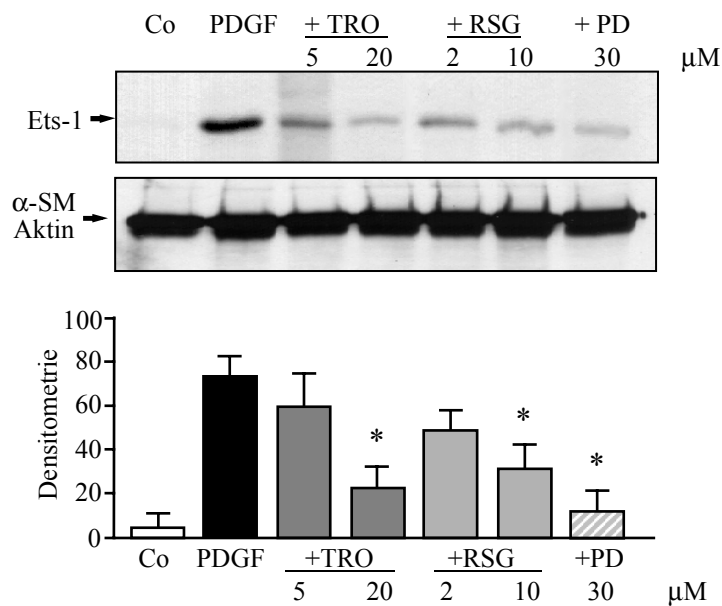
Abb. 12: Der PPAR γ -Ligand TRO hemmt die Angiotensin (AII)-induzierte ERK1/2 MAPK-Translokation vom Zytosol in den Nukleus. (A) Repräsentativer Western Blot nukleärer und zytosolischer Zellextrakte aortaler Rattengefäßmuskelzellen. Untersuchung mit Antikörpern gegen Gesamt-ERK1/2 MAPK. (B) Densitometrie von 3 Western Blot Analysen, Darstellung als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ vs AII allein) [6].

Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren durch PPAR γ -Liganden

Im Folgenden untersuchten wir den Einfluß von PPAR γ -Liganden auf ERK1/2 MAPK-regulierte, nukleäre Komponenten der Migration. Hierzu konnten wir *in vivo* und *in vitro* zeigen, daß die PPAR γ -Liganden Troglitazon und Rosiglitazon die Migration glatter Gefäßmuskelzellen downstream der zytosolischen Aktivierung von ERK1/2 MAPK hemmen, indem sie die ERK1/2 MAPK-abhängige Expression von Ets-1 inhibieren (Abbildung 13) [8]. Der Transkriptionsfaktor Ets-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Migration, da er die Synthese der Matrixmetalloproteinasen 1,3 und 9 reguliert, die ihrerseits durch den Abbau extrazellulärer Matrixproteine den Gefäßmuskelzellen eine Invasion und Durchquerung der die Gefäßmedia und Intima trennenden Lamina elastica interna erlauben [1, 48, 55]. Folgerichtig konnten wir in weiterführenden Untersuchungen an Monozyten und Rattengefäßmuskelzellen eine Inhibition der induzierbaren MMP-9 Synthese durch PPAR γ -Liganden, nicht aber durch PPAR α -Liganden, nachweisen, was mit Ergebnissen von Marx *et al.* aus Arbeiten an humanen Gefäßmuskelzellen übereinstimmt [18, 32].

Abb. 13:

(A)



(B)

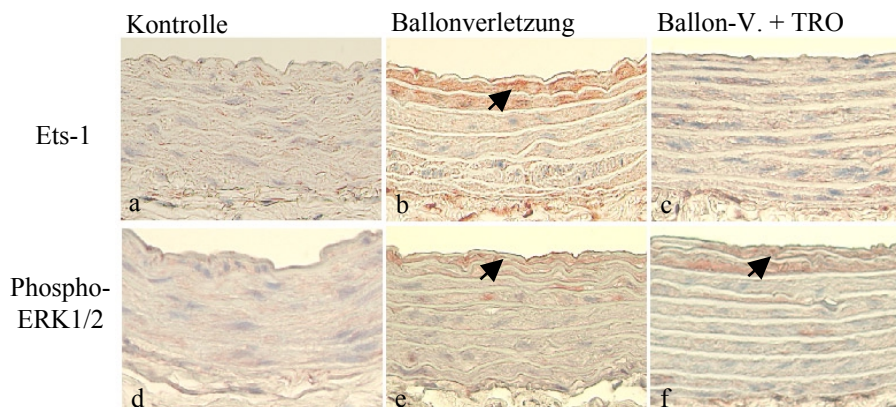


Abb. 13: Die Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 ist ERK1/2 MAPK-abhängig und wird durch PPAR γ -Liganden in vitro und in vivo gehemmt. (A) Western Blot Untersuchung aortaler Rattengefäßmuskulenzellen mit Ets-1-Antikörpern nach Stimulation mit PDGF und Behandlung mit den PPAR γ -Liganden TRO und RSG, oder dem pharmakologischen ERK1/2 MAPK Pathway Inhibitor PD98059 (unten: Densitometrie, n=3, Mittelwert \pm SEM; * p < 0.05 vs. PDGF allein). (B) Immunhistochemischer Nachweis von Ets-1 und phosphorylierter, aktivierter ERK1/2 MAPK in Rattenaorten 2 h nach Ballonangioplastie (Pfeil); Hemmung der Verletzungs-induzierten Ets-1 Expression durch Behandlung mit TRO [8].

Im Gegensatz zur nukleären ERK1/2-abhängigen Signaltransduktion via Ets-1 wird die zytosolische MLCK-Aktivierung downstream von ERK1/2 nicht durch PPAR γ -Liganden gehemmt, die somit vermutlich keinen Einfluß auf die MLCK-gesteuerte Motilitätsmaschinerie in Gefäßmuskulenzellen haben (Abbildung 14) [8].

Zusammenfassend läßt sich daraus folgern, daß die migrationshemmende Wirkung von PPAR γ -Liganden auf einer Inhibition der chemotaktischen Signalübertragung via ERK1/2 MAPK \rightarrow Ets-1 \rightarrow MMP-9 beruht (Abbildung 15).

Abb. 14:

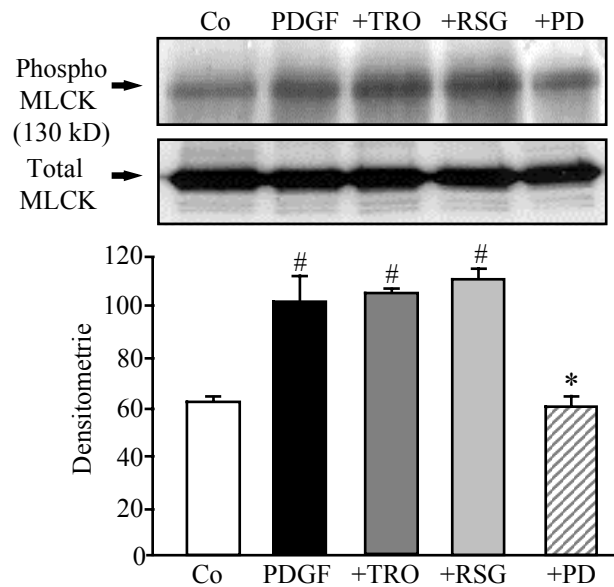


Abb. 14: Die Phosphorylierung von MLCK ist ERK1/2 MAPK-abhängig und wird durch die PPAR γ -Liganden TRO und RSG nicht gehemmt. (A) Untersuchung PDGF-stimulierter aortaler Rattengefäß-muskelzellen mit Western Blotting gegen Phospho-Serin nach vorangegangener Immunpräzipitation von MLCK. Hemmung der PDGF-induzierten MLCK-Phosphorylierung durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK Pathway Inhibitor PD98059. (B) Densitometrie von 3 Western Blot Analysen, Darstellung als Mittelwert \pm SEM; # $p < 0.05$ vs. Kontrolle, * $p < 0.05$ vs PDGF allein) [8].

Abb. 15:

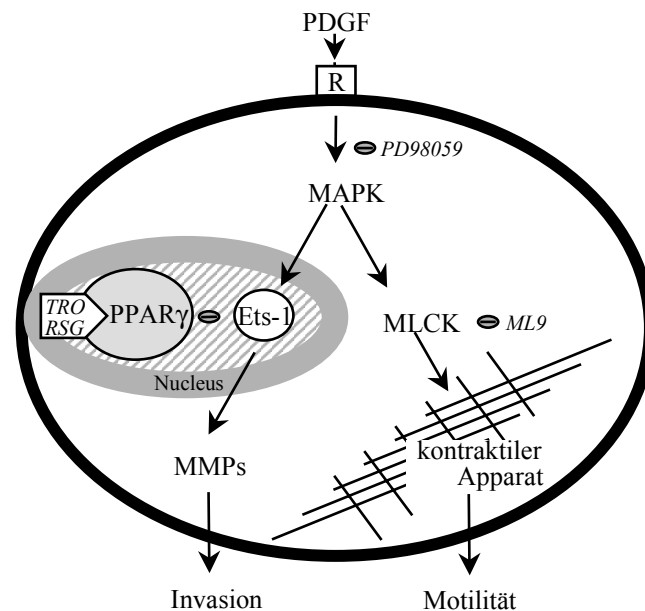


Abb. 15: Die Aktivierung der ERK1/2 MAPK stellt einen Aufzweigungspunkt der chemotaktischen Signaltransduktion in Gefäßmuskelzellen dar. PPAR γ -Liganden hemmen durch Inhibition der ERK1/2-abhängigen Ets-1 Expression und der MMP9-Synthese die Zellinvasion. In der Abbildung sind die an der Zellinvasion und der Motilität beteiligten zytosolischen und nukleären Mechanismen zusammenfassend schematisch dargestellt [8].

PPARs hemmen die endotheliale Migration via Inhibition des Akt → eNOS Signalwegs

Untersuchungen an Endothelzellen und Monozyten ergaben, daß PPAR γ - und PPAR α -Liganden auch in diesen Zellen keinen Effekt auf die zytosolische Aktivierung und Phosphorylierung von ERK1/2 MAPK haben [17, 32]. Im Gegensatz zu Gefäßmuskelzellen jedoch, bei denen wir keinen Effekt der PPAR-Liganden auf die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) → Akt Signalwegs hatten nachweisen können [14], beobachteten wir in Endothelzellen eine signifikante Hemmung der Migrationsfaktor-induzierten Akt-Phosphorylierung durch verschiedene PPAR γ - und PPAR α -Liganden (Abbildung 16) [16, 17]. Neben der Aktivierung von Akt wurde auch die downstream von Akt gelegene Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch alle untersuchten PPAR γ - und PPAR α -Liganden gehemmt [17]. Daraus folgt, daß PPAR α - und γ -Liganden die endotheliale Migration durch Inhibition des PI3K → Akt → eNOS Signalings hemmen.

Abb. 16:

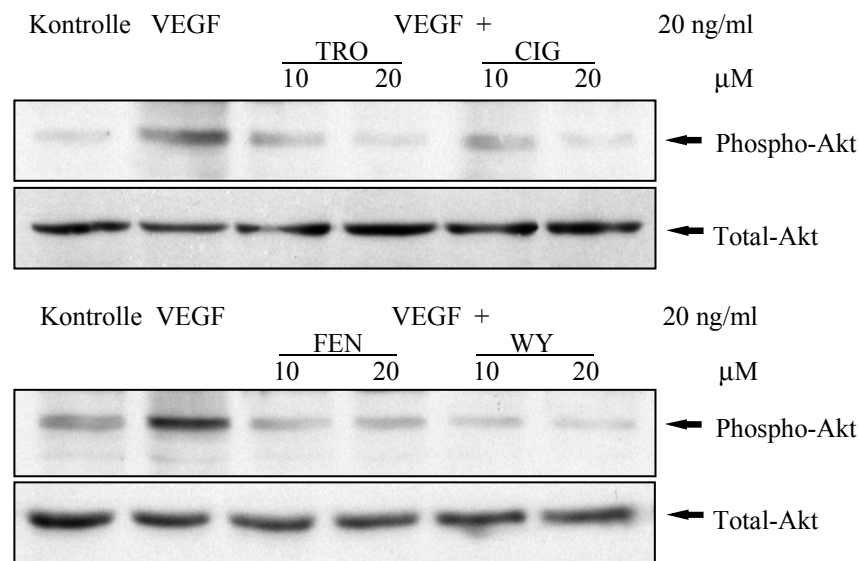


Abb. 16: PPAR-Liganden hemmen die VEGF-induzierte Akt-Phosphorylierung in Endothelzellen. Western Blot Untersuchungen VEGF-stimulierter HUVEC und Behandlung mit den PPAR γ -Liganden TRO / CIG und den PPAR α -Liganden FEN / WY [17].

Eine mögliche Erklärung für die Hemmung der Migrationsfaktor-induzierten Akt-Aktivierung durch PPAR-Liganden ergibt sich aus aktuellen Daten unserer Arbeitsgruppe, in denen wir zeigen konnten, daß PPAR γ -Liganden die Expression des Tumorsuppressor Gens PTEN in Endothelzellen induzieren [16]. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Patel et al. in Makrophagen erhoben [56]. PTEN ist eine duale Protein- und Phosphoinositid-Phosphatase, die den PI3K → Akt Signalweg negativ reguliert und die Aktivierung und Phosphorylierung von Akt inhibiert [57], und somit ein mögliches Target der migrationshemmenden Wirkung von PPAR-Liganden in Endothelzellen darstellt (Abbildung 17).

Die migrationshemmenden Effekte von PPARs auf Endothelzellen spielen möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose, da hier die Endothelzellmigration zur Neovaskularisierung des atherosklerotischen Plaques und damit zu einer erhöhten Vulnerabilität für eine Plaque-Ruptur beiträgt [1].

Abb. 17:

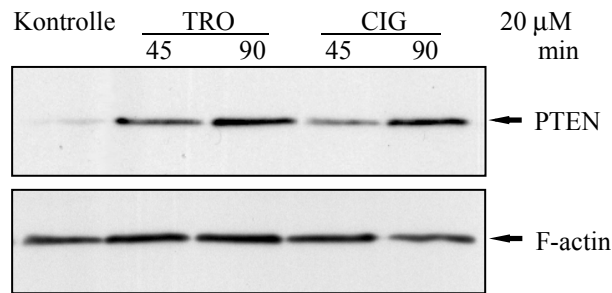


Abb. 17: Die PPAR γ -Liganden TRO und CIG induzieren die Expression der Phosphatase PTEN in Endothelzellen. Repräsentative Western Blot Untersuchung der zeitabhängigen Zunahme der PTEN-Expression in HUVEC nach Stimulation mit TRO oder CIG. (F-Actin dient als interne Kontrolle) [16].

2.4 Hemmung der Gefäßmuskelzellproliferation durch PPARs und ihre Effekte auf die ERK1/2 MAPK-abhängige mitogene Signaltransduktion

2.4.1 PPAR γ -Liganden hemmen die Gefäßmuskelzellproliferation

Neben den migrationshemmenden Wirkungen von PPAR γ -Liganden untersuchten wir auch ihre Effekte auf die Gefäßmuskelzellproliferation, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese atherosklerotischer Plaques und restenosebedingter Gefäßwandläsionen spielt [1, 5, 34]. Wir konnten nachweisen, daß verschiedene PPAR γ -Liganden (Troglitazon, Rosiglitazon, 15d-PGJ2) zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der durch unterschiedliche Mitogene (bFGF, All, Insulin) induzierten DNA-Synthese in humanen und Rattengefäßmuskelzellen führen (Abbildung 18) [14, 15]. Die beobachtete antiproliferative Effektivität der untersuchten PPAR γ -Liganden war in unseren Untersuchungen mit ihrer migrationshemmenden Wirkung vergleichbar.

Abb. 18:

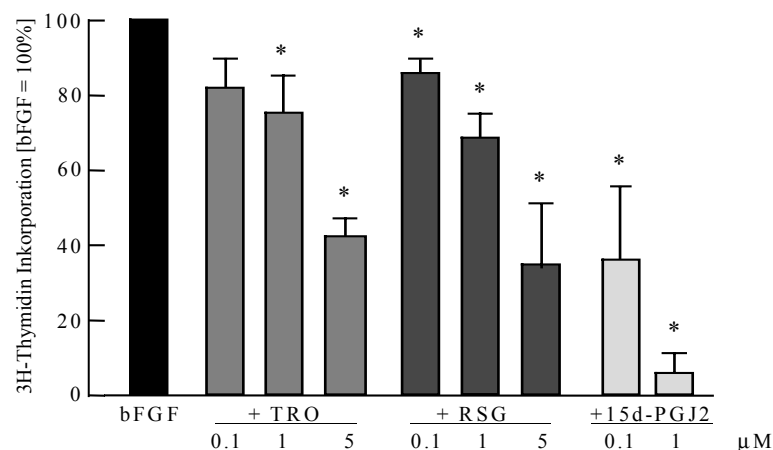


Abb. 18: PPAR γ -Liganden hemmen die bFGF-induzierte Gefäßmuskelzell-Proliferation. (3H-Thymidin Inkorporation aortaler Ratten-Gefäßmuskelzellen 24 h nach Stimulation mit bFGF; PPAR γ -Liganden = TRO, RSG, 15d-PGJ2; Darstellung als Mittelwert \pm SEM; n= 6; * p < 0.05 vs. bFGF allein) [15].

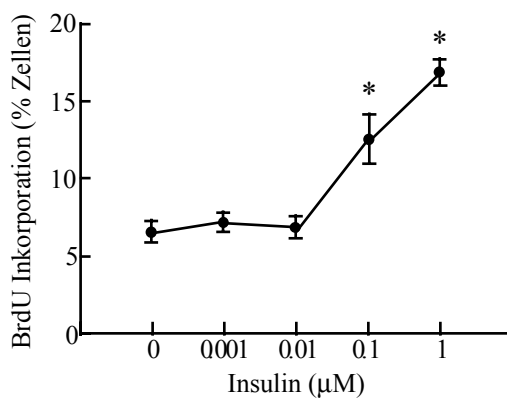
2.4.2 Bedeutung des ERK1/2 MAPK-Signalwegs in der Gefäßmuskelzellproliferation

Es ist bekannt, daß die ERK1/2 MAPK nicht nur eine Schlüsselrolle in der Migration spielt, sondern auch mitogene Signale bei der Zellproliferation überträgt. Wir führten daher Untersuchungen an Gefäßmuskelzellen mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren durch und konnten mithilfe von Antisense-Strategien und pharmakologischen Inhibitoren nachweisen, daß die Proliferation dieser Zellen nach Stimulation mit Insulin, AII oder PDGF ERK1/2 MAPK-abhängig vermittelt wird [38, 58, 59]. Da wir gezeigt hatten, daß die zytosolische ERK1/2 MAPK Aktivierung nicht durch PPAR γ -Liganden beeinflusst wird, suchten wir Komponenten der mitogenen Signaltransduktion, die downstream von ERK1/2 MAPK liegen. Eine besondere Rolle nahm dabei die Untersuchung der Mechanismen der Insulin-induzierten mitogenen Signaltransduktion in der Gefäßmuskulatur ein, da diese insbesondere im Zusammenhang mit der antidiabetischen Wirkung der PPAR γ -Liganden interessant sind.

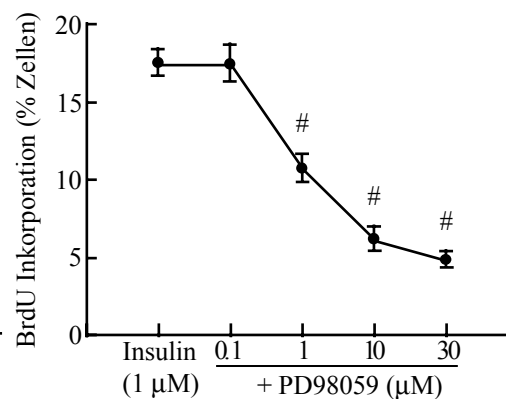
Insulin führt durch Bindung an den Insulin-Rezeptor zu einer Rezeptor-Autophosphorylierung, die als Teil verschiedener Kaskaden zytosolischer Protein-Kinasen die ERK1/2 MAPK aktiviert [58, 60], welche nach ihrer nukleären Translokation spezifische Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die ihrerseits die Expression von zellwachstumsassoziierten "Early-Response"-Genen wie c-fos induzieren [40, 41]. Ein solcher Transkriptionsfaktor ist Elk-1, der durch ERK1/2 MAPK an Serin- und Threoninstellen phosphoryliert wird [40] und durch Interaktion mit dem in der Promotorregion liegenden Serum-Response-Element (SRE) die Expression des c-fos Gens reguliert [41].

Wir konnten nachweisen, daß der pharmakologische ERK1/2 MAPK Pathway Inhibitor PD98059 neben einer dosisabhängigen Hemmung der Insulin-induzierten Proliferation auch die Expression von c-fos-mRNA hemmt [59]. Um die Beteiligung weiterer Komponenten der Signaltransduktionskaskade zu untersuchen, nahmen wir transiente Transfektionen glatter Gefäßmuskelzellen mit einem Elk-1/Gal-Expressionsvektor und seinem Gal/CAT Reporter Plasmid, beziehungsweise mit SRE/CAT Reporter Plasmiden vor. Sowohl für Elk-1, als auch für das SRE konnte in transfizierten Zellen eine signifikante Aktivierung durch Insulin gezeigt werden, die durch PD98059 gehemmt wurde [59]. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß dem ERK1/2 MAPK \rightarrow Elk-1 \rightarrow SRE \rightarrow c-fos Pathway eine entscheidende Rolle in der mitogenen Signaltransduktion Insulins in Gefäßmuskelzellen zukommt (Abbildungen 19).

Abb. 19 (A)



(B)



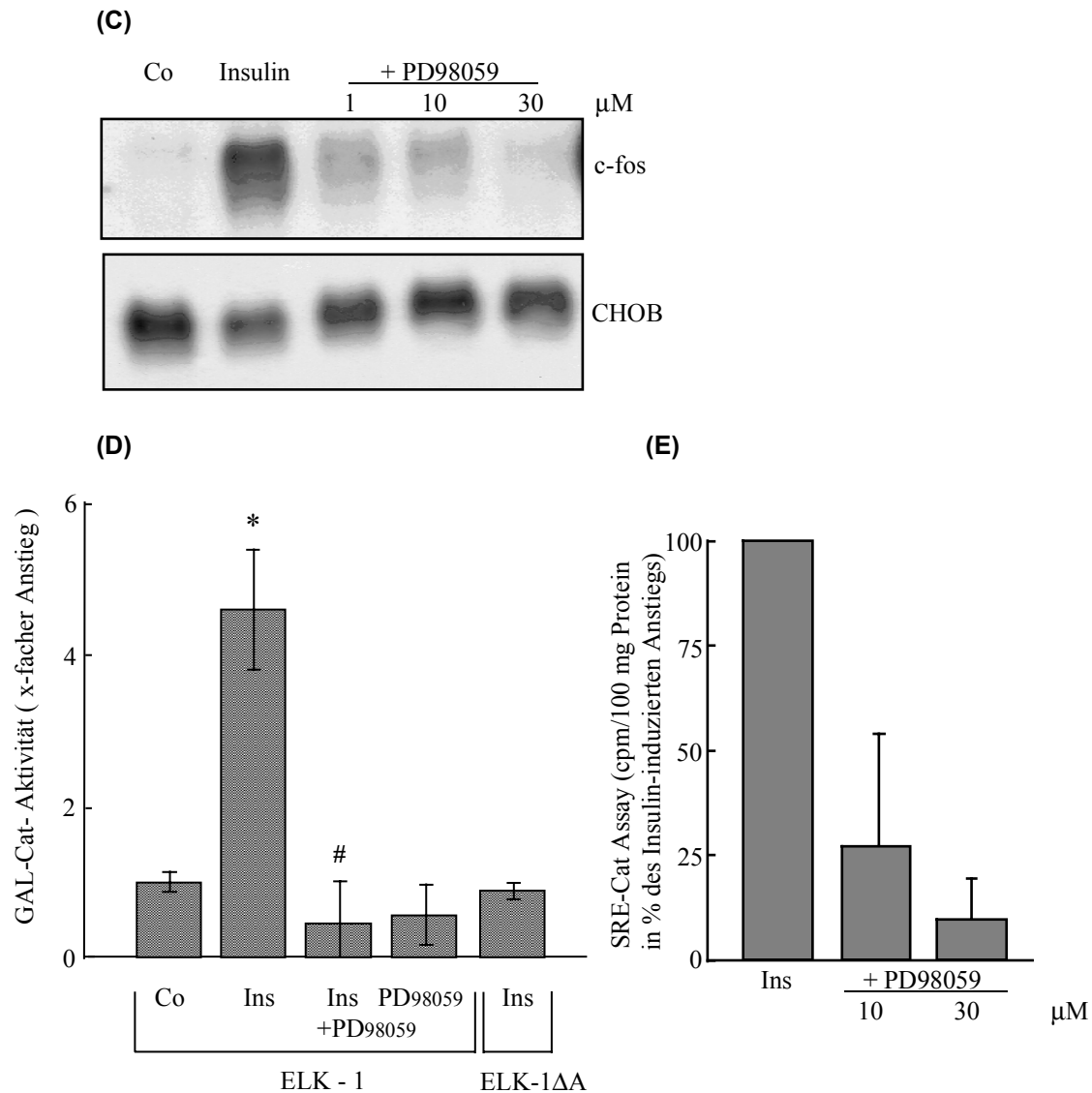


Abb. 19: Insulin stimuliert die ERK1/2 MAPK-abhängige Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Die Insulin-induzierte BrdU-Inkorporation aortaler Rattengefäßmuskelzellen (A) wird durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK Pathway Inhibitor PD98059 konzentrationsabhängig gehemmt (B). (C) Repräsentativer Northern Blot der Insulin-stimulierten mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors c-fos und der Hemmung durch PD98059 (CHOB dient als interne Kontrolle). Darstellung der Ergebnisse von Transfektionsexperimenten, die eine Hemmung der Insulin-induzierten Aktivierung von Elk-1 (D) und SRE (E) durch PD98059 nachweisen. (Werte als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.01$ vs. Kontrolle, # $p < 0.01$ vs Insulin allein, Elk-1ΔA: Negativ-Mutante ohne Elk-1 / MAPK-Phosphorylierungsstelle) [59].

2.4.3 Hemmung der ERK1/2 MAPK-vermittelten mitogenen Signaltransduktion durch PPAR γ

Elk-1 gehört ebenso wie Ets-1 zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren, die von einigen Autoren als eine Familie nukleärer Effektoren des Ras \rightarrow Raf \rightarrow ERK1/2 MAPK Pathways angesehen werden [61]. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zur Ets-1-Inhibition durch PPAR γ -Liganden beobachteten wir in weiterführenden Transfektionsexperimenten auch eine Hemmung der Insulin-stimulierten Elk-1-Aktivierung durch den PPAR γ -Liganden Troglitazon (Abbildung 20) [14]. Zusammenfassend bedeutet dies, daß PPAR γ -Liganden in Gefäßmuskelzellen die mitogene Signaltransduktion via ERK1/2 MAPK \rightarrow Elk-1 \rightarrow SRE \rightarrow c-fos hemmen.

Abb. 20:

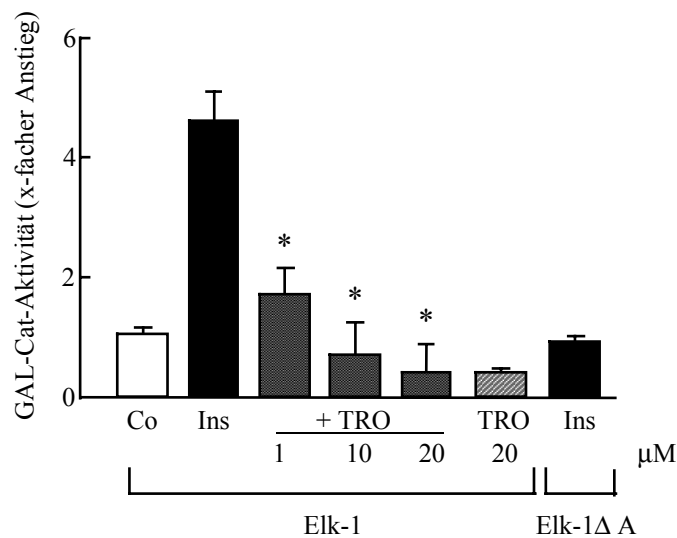


Abb. 20: Der PPAR γ -Ligand TRO hemmt die Insulin-induzierte Elk-1 Aktivierung. Transfektionsexperimente aortaler Rattengefäßmuskelzellen analog zu Abbildung 18 D unter Zugabe von TRO in ansteigenden Konzentrationen. (Werte als Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.01$ vs. Insulin allein, Elk-1 Δ A: Negativ-Mutante ohne Elk-1 / MAPK-Phosphorylierungsstelle) [14].

3. Zusammenfassung

Die Migration und Proliferation vaskulärer und inflammatorischer Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen und trägt zudem in hohem Maße zu restenosebedingten Komplikationen interventioneller Therapien der Atherosklerose bei. Dies bedingt ein großes Interesse an pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten zur Prävention / Therapie atherosklerotischer und restenotischer vaskulärer Läsionen. Dabei kommen neben lokal applizierbaren Substanzgruppen insbesondere Pharmaka in Betracht, die bereits Anwendung zur Behandlung metabolischer Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen finden. Hierzu gehören die oralen Antidiabetika vom Typ der Thiazolidindione, die als Liganden für den "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ " (PPAR γ) agieren, und die lipidsenkenden Fibrate, die den PPAR-Subtyp- α (PPAR α) aktivieren. PPARs sind eine Gruppe neuer Regulatoren der Genexpression, für die in den vergangenen Jahren eine Reihe vaskulärer Wirkungen nachgewiesen wurden. Die Expression der Isoformen PPAR α und PPAR γ in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen / Monozyten wurde durch Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen etabliert und wir konnten nachweisen, daß die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen, sowie die Migration von Endothelzellen und Monozyten durch PPAR-Liganden gehemmt wird. Untersuchungen zu den beteiligten Signalübertragungsschritten ergaben, daß die pharmakologische Aktivierung von PPAR γ in Gefäßmuskelzellen insbesondere die durch die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen ERK1/2 vermittelte Signaltransduktion beeinflusst. Wir haben gezeigt, daß die ERK1/2 MAPK eine Schlüsselrolle in der Proliferation und Migration spielt, indem sie als intrazellulärer Knotenpunkt konvergierender Signale die mitogene und chemotaktische Signalübertragung ausgehend von sehr unterschiedlichen Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Die besondere Bedeutung der ERK1/2 MAPK in der Proliferation und Migration ist vor allem darauf zurückzuführen, daß sie sowohl zytosolische Signalproteine als auch nukleäre Faktoren aktivieren kann. Denn nach ihrer zytosolischen Aktivierung transloziert die MAPK in den Zellkern, wo sie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktiviert, die wiederum die Expression von Genen regulieren und damit das Zellverhalten modulieren. Interessanterweise hemmt PPAR γ nicht die zytosolische Aktivierung der MAPK sondern die nachgeschaltete Signaltransduktion. Wir konnten nachweisen, daß die durch Stimulation mit dem Wachstums- und Migrationsfaktor Angiotensin II induzierte ERK1/2 MAPK Translokation in den Zellkern durch den PPAR γ -Ligand Troglitazon gehemmt wird. Dies stellt wahrscheinlich einen entscheidenden Mechanismus für die PPAR γ -vermittelte Hemmung der durch Wachstumsfaktoren stimulierten, ERK1/2 MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 dar, der wiederum die Expression des zellwachstums-assoziierten c-fos Gens reguliert. Ebenso konnten wir zeigen, daß PPAR γ -Aktivierung die nach Stimulation mit Migrationsfaktoren MAPK-abhängig induzierte Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 *in vivo* und *in vitro* hemmt. Ets-1 reguliert die Synthese der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9), die durch den Abbau extrazellulärer Matrixproteine den Gefäßmuskelzellen eine Invasion und Durchquerung der die Gefäßmedia und Intima trennenden Lamina elastica interna erlaubt. Folgerichtig wurde die Hemmung der MAPK-abhängig regulierten MMP-9 Synthese durch PPAR γ -Liganden von unserer und anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen. Zusammenfassend bedeutet dies, daß PPAR γ in Gefäßmuskelzellen die mitogene Signaltransduktion via ERK1/2 MAPK \rightarrow Elk-1 \rightarrow c-fos und die chemotaktische Signalübertragung via ERK1/2 MAPK \rightarrow Ets-1 \rightarrow MMP-9 hemmt.

Wir konnten ferner zeigen, daß PPAR α - und PPAR γ -Liganden die Endothelzellmigration hemmen, die durch die Neovaskularisation atherosklerotischer Plaques und der damit verbundenen erhöhten Vulnerabilität einer Plaqueruptur eine Rolle in der Pathobiologie der Atherosklerose spielt. Diese migrationshemmende Wirkung der PPAR-Liganden basiert vermutlich auf einer Inhibition der für die Endothelzellmigration erforderlichen Signaltransduktion über den PI3 Kinase \rightarrow Akt \rightarrow eNOS Pathway. Die Inhibition dieses Signalwegs könnte die Folge der von uns beobachteten PPAR-Ligand-induzierten Expression der Phosphatase PTEN sein, die den PI3K \rightarrow Akt Signalweg negativ reguliert und die Aktivierung und Phosphorylierung von Akt inhibiert.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse zur Proliferation und Migration vaskulärer und inflammatorischer Zellen wird durch *in vivo* Untersuchungen im Menschen und im Tiermodell belegt, die sowohl eine Reduktion der Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie, als auch eine Verminderung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen bei einer Pharmakotherapie mit PPAR γ -Liganden vom Typ der Thiazolidindione beobachteten [30, 62, 63, 64, 65]. Auch die Behandlung mit PPAR α -aktivierenden Fibraten zeigt einen günstigen Einfluß auf die Progression atherosklerotischer Gefäßwand-

veränderungen, wie dies in einer Reihe größerer klinischer Studien nachgewiesen werden konnte [66, 67, 68, 69, 70, 71].

Somit haben PPAR-aktivierende Liganden eine wichtige Funktion in der Behandlung der metabolischen Hauptrisikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen, spielen aber gleichzeitig eine vermutlich ebenso wichtige Rolle in der Protektion atherosklerotischer und restenosebedingter Gefäßwandveränderungen durch direkte vaskuläre Effekte.

Literaturverzeichnis

- [1] Lusis, A. J. (2000): Atherosclerosis, *Nature* (vol. 407), No. 6801, pp. 233-41.
- [2] Libby, P.; Ridker, P.M. and Maseri, A. (2002): Inflammation and atherosclerosis, *Circulation* (vol. 105), pp. 1135-43.
- [3] Ross, R. (1999): Atherosclerosis - an inflammatory disease, *N Engl J Med* (vol. 340), pp. 115-26.
- [4] Raines, E. W. and Ross, R. (1993): Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis, *Br Heart J* (vol. 69), No. 1 Suppl, pp. S30-7.
- [5] Ross, R. (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* (vol. 362), No. 6423, pp. 801-9.
- [6] Goetze, S.; Xi, X-P.; Graf, K.; Fleck, E.; Hsueh, W.A. and Law, R.E. (1999): Troglitazone inhibits AII-induced ERK 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett* (vol. 452), pp. 277-82.
- [7] Goetze, S.; Kintscher, U.; Kaneshiro, K.; Meehan, W. P.; Collins, A.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (2001): TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2, *Atherosclerosis* (vol. 159), No. 1, pp. 93-101.
- [8] Goetze, S.; Kintscher, U.; Kim, S.; Meehan, W.P.; Kaneshiro, K.; Collins, A.R.; Fleck, E.; Hsueh, W.A. and Law, R.E. (2001): PPARgamma-ligands inhibit nuclear but not cytosolic ERK-MAPK-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration., *J Cardiovasc Pharmacol* (vol. 38), pp. 909-921.
- [9] Barbier, O.; Torra, I.P.; Duguay, Y.; Blanquart, C.; Fruchart, J.C.; Glineur, C. and Staels, B. (2002): Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis., *Arterioscl Thromb Vasc Biol* (vol. 22), pp. 717-26.
- [10] Hsueh, W.A. and Law, R.E: (2001): PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (vol. 21), pp. 1891-5.
- [11] Neve, B. P.; Fruchart, J. and Staels, B. (2000): Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis, *Biochem Pharmacol* (vol. 60), No. 8, pp. 1245-50.
- [12] Bishop-Bailey, D. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system, *Br J Pharmacol* (vol. 129), No. 5, pp. 823-34.
- [13] Goetze, S.; Xi, X. P.; Kawano, H.; Gotlibowski, T.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. 1999): PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells, *J Cardiovasc Pharmacol* (vol. 33), No. 5, pp. 798-806.
- [14] Goetze, S.; Kim, S. ; Xi, X.P.; Graf, K.; Yang, D.C.; Fleck, E.; Meehan, P.W.; Hsueh, W.A. and Law, R.E. (2000): Troglitazone inhibits mitogenic signaling by insulin in vascular smooth muscle cells, *J Cardiovasc Pharmacol* (vol. 35), pp. 749-57.
- [15] Law, R. E.; Goetze, S.; Xi, X. P.; Jackson, S.; Kawano, Y.; Demer, L.; Fishbein, M. C.; Meehan, W. P. and Hsueh, W. A. (2000): Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells, *Circulation* (vol. 101), No. 11, pp. 1311-8.
- [16] Goetze, S.; Bungenstock, A.; Eilers, F.; Czupalla, C.; Stawowy, P; Kintscher, U.; Spencer-Hänsch, C.; Nürnberg, B.; Graf, K.; Law, R.E.; Fleck, E. and Gräfe, M (2002): Leptin-induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPAR γ -ligands, *Hypertension* (vol. 40), pp. 748-54.
- [17] Goetze, S.; Eilers, F.; Bungenstock, A.; Kintscher, U.; Stawowy, P.; Blaschke, F.; Graf, K.; Law, R.E.; Fleck, E. and Gräfe, M. (2002): PPAR-activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt, *Biochem Biophys Res Comm* (vol. 293), pp. 1431-7.

-
- [18] Marx, N.; Schonbeck, U.; Lazar, M. A.; Libby, P. and Plutzky, J. (1998): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells, *Circ Res* (vol. 83), No. 11, pp. 1097-103.
- [19] Marx, N.; Sukhova, G.; Murphy, C.; Libby, P. and Plutzky, J. (1998): Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation- dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro, *Am J Pathol* (vol. 153), No. 1, pp. 17-23.
- [20] Marx, N.; Bourcier, T.; Sukhova, G. K.; Libby, P. and Plutzky, J. (1999): PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (vol. 19), No. 3, pp. 546-51.
- [21] Bishop-Bailey, D. and Hla, T. (1999): Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 24, pp. 17042-8.
- [22] Staels, B.; Koenig, W.; Habib, A.; Merval, R.; Lebre, M.; Torra, I. P.; Delerive, P.; Fadel, A.; Chinetti, G.; Fruchart, J. C.; Najib, J.; Macclouf, J. and Tedgui, A. (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, *Nature* (vol. 393), No. 6687, pp. 790-3.
- [23] Kliewer, S.A.; Sundseth, S.S.; Jones, S.A.; Brown, P.J.; Wisely, G.B.; Koble, C.S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T.M.; Lenhard, J.M. and Lehmann, J.M. (1997): Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma., *Proc Natl Acad Sci* (vol. 94), pp. 4318-23.
- [24] Forman, B.M.; Chen, J. and Evans, R.M. (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta., *Proc Natl Acad Sci* (vol. 94), pp. 4312-17.
- [25] Kliewer, S. A.; Lenhard, J. M.; Willson, T. M.; Patel, I.; Morris, D. C. and Lehmann, J. M. (1995): A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *Cell* (vol. 83), No. 5, pp. 813-9.
- [26] Nagy, Laszlo; Tontonoz, Peter; Alvarez, Jacqueline G. A.; Chen, Hongwu and Evans, Ronald M. (1998): Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR γ , *Cell* (vol. 93), No. April 17, pp. 229-240.
- [27] Lehmann, J. M.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Wilkison, W. O.; Willson, T. M. and Kliewer, S. A. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), *J Biol Chem* (vol. 270), No. 22, pp. 12953-6.
- [28] Schoonjans, K.; Peinado-Onsurbe, J.; Lefebvre, A.M.; Heyman, R.A.; Briggs, M.; Deeb, S.; Staels, B. and Auwerx, J. (1996): PPARalpha and gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene., *EMBO J* (vol. 15), pp. 5336-48.
- [29] Marx, N. and Hombach, V. (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the vessel wall: new regulators of gene expression in vascular cells, *Z Kardiol* (vol. 90(7)), pp. 470-7.
- [30] Law, R. E.; Meehan, W. P.; Xi, X. P.; Graf, K.; Wuthrich, D. A.; Coats, W.; Faxon, D. and Hsueh, W. A. (1996): Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia, *J Clin Invest* (vol. 98), No. 8, pp. 1897-905.
- [31] Goetze, S.; Xi, X. P.; Kawano, Y.; Kawano, H.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (1999): TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent, *Hypertension* (vol. 33), No. 1 Pt 2, pp. 183-9.
- [32] Kintscher, U.; Goetze, S.; Wakino, S.; Kim, S.; Nagpal, S.; Chandraratna, R. A.; Graf, K.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of

- monocytes, *Eur J Pharmacol* (vol. 401), No. 3, pp. 259-70.
- [33] Nigro, J.; Dilley, R.J. and Little, P.J. (2002): Differential effects of gemfibrozil on migration, proliferation and proteoglycan production in human vascular smooth muscle cells., *Atherosclerosis* (vol. 162), pp. 119-29.
- [34] Schwartz, S. M. (1997): Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis, *J Clin Invest* (vol. 99), No. 12, pp. 2814-6.
- [35] Casscells, W. (1992): Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis, *Circulation* (vol. 86), No. 3, pp. 723-9.
- [36] Graf, K.; Xi, X. P.; Yang, D.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (1997): Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet- derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells, *Hypertension* (vol. 29), No. 1 Pt 2, pp. 334-9.
- [37] Nelson, P. R.; Yamamura, S.; Mureebe, L.; Itoh, H. and Kent, K. C. (1998): Smooth muscle cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of the intracellular messenger mitogen-activated protein kinase, *J Vasc Surg* (vol. 27), No. 1, pp. 117-25.
- [38] Xi, X-P.; Graf, K.; Goetze, S.; Fleck, E.; Hsueh, W.A. and Law, R.E. (1999): Central Role of the MAPK pathway in All-mediated DNA-synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (vol. 19), pp. 73-82.
- [39] Klemke, R. L.; Cai, S.; Giannini, A. L.; Gallagher, P. J.; de Lanerolle, P. and Cheresch, D. A. (1997): Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase, *J Cell Biol* (vol. 137), No. 2, pp. 481-92.
- [40] Gille, H.; Kortenjann, M.; Thomae, O.; Moomaw, C.; Slaughter, C.; Cobb, M. H. and Shaw, P. E. (1995): ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation, *Embo J* (vol. 14), No. 5, pp. 951-62.
- [41] Gille, H.; Kortenjann, M.; Strahl, T. and Shaw, P. E. (1996): Phosphorylation-dependent formation of a quaternary complex at the c- fos SRE, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 3, pp. 1094-102.
- [42] Cheresch, D. A.; Leng, J. and Klemke, R. L. (1999): Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells, *J Cell Biol* (vol. 146), No. 5, pp. 1107-16.
- [43] Pauly, R. R.; Passaniti, A.; Bilato, C.; Monticone, R.; Cheng, L.; Papadopoulos, N.; Gluzband, Y. A.; Smith, L.; Weinstein, C.; Lakatta, E. G. and et al. (1994): Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation, *Circ Res* (vol. 75), No. 1, pp. 41-54.
- [44] Zempo, N.; Koyama, N.; Kenagy, R. D.; Lea, H. J. and Clowes, A. W. (1996): Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (vol. 16), No. 1, pp. 28-33.
- [45] Haas, T.L.; Stitelmann, D.; Davis, S.J.; Apte, S.S. and Madri, J.A. (1999): Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type I matrix metalloproteinase in endothelium., *J Biol Chem* (vol. 274), pp. 22679-685.
- [46] Westermarck, J. and Kahari, V.M. (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion, *FASEB J* (vol. 13), pp. 781-792.
- [47] Santiago, F.S.; Atkins, D.G. and Kachigian, L.M. (1999): Vascular smooth muscle cell proliferation and regrowth after mechanical injury in vitro are Egr-1/NGFI-A-dependent, *Am J Pathol* (vol. 155), pp. 897-905.

-
- [48] Iwasaka, I.; Tanaka, K.; Abe, M. and Sato, Y. (1996): Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells, *J Cell Physiol* (vol. 169), pp. 522-531.
- [49] Dimmeler, S.; Dernbach, E. and Zeiher, A. M. (2000): Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration, *FEBS Lett* (vol. 477), No. 3, pp. 258-62.
- [50] Duan, C.; Bauchat, J. R. and Hsieh, T. (2000): Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration, *Circ Res* (vol. 86), No. 1, pp. 15-23.
- [51] Imai, Y. and Clemmons, D. R. (1999): Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and deoxyribonucleic acid synthesis by insulin-like growth factor-I, *Endocrinology* (vol. 140), No. 9, pp. 4228-35.
- [52] Ricote, M.; Li, A. C.; Willson, T. M.; Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998): The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* (vol. 391), No. 6662, pp. 79-82.
- [53] Fukuda, M.; Gotoh, Y. and Nishida, E. (1997): Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase, *Embo J* (vol. 16), No. 8, pp. 1901-8.
- [54] Liao, D. F.; Monia, B.; Dean, N. and Berk, B. C. (1997): Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 10, pp. 6146-50.
- [55] Oda, N.; Abe, M. and Sato, Y. (1999): ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3, *J Cell Physiol* (vol. 178), No. 2, pp. 121-32.
- [56] Patel, L.; Pass, I.; Coxon, P.; Downes, C.P.; Smith, S.A. and Macphee, C.H. (2001): Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN, *Curr Biol* (vol. 11), pp. 764-8.
- [57] Arico, S.; Petiot, A.; Bauvy, C.; Dubbelhuis, P.F.; Meijer, A.J.; Codogno, P. and Ogier-Denis, E. (2001): The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the PI3 Kinase / PKB pathway, *J Biol Chem* (vol. 276), pp. 35243-6.
- [58] Goetze, S.; Kintscher, U.; Kawano, H.; Kawano, Y.; Wakino, S.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (2000): Tumor necrosis factor alpha inhibits insulin-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 24, pp. 18279-83.
- [59] Xi, X. P.; Graf, K.; Goetze, S.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (1997): Inhibition of MAP kinase blocks insulin-mediated DNA synthesis and transcriptional activation of c-fos by Elk-1 in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett* (vol. 417), No. 3, pp. 283-6.
- [60] Saltiel, A. R. (1996): Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin, *Am J Physiol* (vol. 270), No. 3 Pt 1, pp. E375-85.
- [61] Wasylyk, B.; Hagman, J. and Hartmann, A.G. (1998): Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-Kinase signaling pathway, *Trends Biochem Sci* (vol. 23), pp. 213-216.
- [62] Collins, A. R.; Meehan, W. P.; Kintscher, U.; Jackson, S.; Wakino, S.; Noh, G.; Palinski, W.; Hsueh, W. A. and Law, R. E. (2001): Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (vol. 21), No. 3, pp. 365-71.
- [63] Minamikawa, J.; Tanaka, S.; Yamauchi, M.; Inoue, D. and Koshiyama, H. (1998): Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid artery wall thickness in type 2 diabetes., *J Clin Endocrinol Metab* (vol. 83), pp. 1818-20.

-
- [64] Koshiyama, H.; Shimono, D.; Kuwamura, N.; Minamikawa, J. and Nakamura, Y. (2001): Inhibitory effect of pioglitazone on carotid artery wall thickness in type 2 diabetes., *J Clin Endocrinol Metab* (vol. 86), pp. 3452-6.
- [65] Zuckerman, S.H.; Kauffman, R.F. and Evans, G.F. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, gamma coagonist LY465608 inhibits macrophage activation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice., *Lipids* (vol. 37), pp. 487-94.
- [66] Hahmann, H.W.; Bunte, T.; Hellwig, N.; Hau, U.; Becker, D.; Dyckmans, J.; Keller, H.E. and Schieffer, H.J. (1991): Progression and regression of minor coronary arterial narrowings by quantitative angiography after fenofibrate therapy., *Am J Cardiol* (vol. 67), pp. 957-61.
- [67] Steiner, G.; Stewart, D. and Hosking, J.D. (1999): Baseline characteristics of the study population in the diabetes atherosclerosis intervention study (DAIS). World health organization collaborating centre for the study of atherosclerosis in diabetes., *Am J Cardiol* (vol. 84), pp. 1004-10.
- [68] de Faire, U.; Ericsson, C.G.; Grip, L.; Nilsson, J.; Svane, B. and Hamsten, A. (1997): Retardation of coronary atherosclerosis: the bezafibrate coronary atherosclerosis intervention trial (BECAIT) and other angiographic trials., *Cardiovasc Drugs Ther* (vol. 11 (Suppl 1)), pp. 257-63.
- [69] Rubins, H.B.; Robins, S.J.; Collins, D.; Fye, C.L.; Anderson, J.W.; Elam, M.B.; Faas, F.H.; Linares, E.; Schaefer, E.J.; Schectman, G.; Wilt, T.J. and Wittes, J. (1999): Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial study group., *N Engl J Med* (vol. 341), pp. 410-8.
- [70] Group, DAIS Study (2001): Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes atherosclerosis intervention study, a randomized study., *Lancet* (vol. 357), pp. 905-10.
- [71] Frick, M.H.; Syväne, M.; Nieminen, M.S.; Kauma, H.; Majahalme, S.; Virtanen, V.; Kesäniemi, Y.A.; Pasternack, A. and Taskinen, M.R. (1997): Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol., *Circulation* (vol. 96), pp. 2137-43.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

All	Wachstumsfaktor (Angiotensin II)
Akt	Proteinkinase
AOSMC	Zelltyp (<u>A</u> ortic <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell)
AP-1	Transkriptionsfaktor
c-fos	Transkriptionsfaktor
CASMC	Zelltyp (<u>C</u> oronary <u>A</u> rtery <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell)
CHOB	interner Standard (<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary Gene <u>B</u>)
CIG	Ciglitazon
CRP	<u>C</u> - <u>R</u> eaktives <u>P</u> rotein
DBD	<u>D</u> NA- <u>B</u> indende <u>D</u> omäne
DANN	Desoxynukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
Egr-1	Transkriptionsfaktor
Elk-1	Transkriptionsfaktor
ENOS	<u>E</u> ndotheliale <u>N</u> O- <u>S</u> ynthase
ERK1/2 MAPK	Proteinkinase (<u>E</u> xtracellular <u>S</u> ignal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inase, Subtyp der <u>M</u> itogen- <u>A</u> ktivierten <u>P</u> rotein <u>K</u> inasen)
Ets-1	Transkriptionsfaktor
FEN	Fenofibrat
FGF	Wachstumsfaktor (<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
HETE	PPARalpha Ligand (Hydroxyeicosatetraenoic Acid)
HODE	PPARgamma Ligand (Hydroxyoctadecadienoic Acid)
HUVEC	Zelltyp (<u>H</u> uman <u>U</u> mbilical <u>V</u> ein <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ell)
IGF-1	Wachstumsfaktor (<u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
MCP-1	Migrationsfaktor (<u>M</u> onocyte <u>C</u> hemoattractant <u>P</u> rotein-1)
MEK	Proteinkinase (ERK MAPK Kinase)
ML9	Pharmakologischer MLCK-Inhibitor)
MLC	Zellprotein (<u>M</u> ysin <u>L</u> ight <u>C</u> hain)
MLCK	Proteinkinase (<u>M</u> ysin <u>L</u> ight <u>C</u> hain <u>K</u> inase)
MMP	Protease (Matrix Metalloproteinase)
MRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	Transkriptionsfaktor
PDGF	Wachstumsfaktor (<u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)

PD98059	Pharmakologischer ERK MAPK Pathway Inhibitor
PGJ2	Prostaglandin (15-deoxy-delta-2,14-Prostaglandin J2)
PI3-Kinase	Proteinkinase (<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>3</u> -Kinase)
PKC ζ	<u>P</u> rotei <u>n</u> ki <u>n</u> ase <u>C</u> Subtyp zeta
PPAR	<u>P</u> eroxisome <u>P</u> roliferator- <u>A</u> ctivated <u>R</u> eceptor
PPRE	<u>P</u> PAR <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
PTEN	Protein- und Phosphoinositid-Phosphatase
RA	<u>R</u> etinoic <u>A</u> cid
RSG	Rosiglitazon
RXR	<u>R</u> etinoid <u>X</u> <u>R</u> ezeptor
SP-1	Transkriptionsfaktor
SRE	<u>S</u> erum <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
TNF α	Zytokin (<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor alpha)
TRO	Troglitazon
TZD	Orale Antidiabetika (Thiazolidindeone)
UASMC	Zelltyp (<u>U</u> mbilical <u>A</u> rtery <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell)
VEGF	Wachstumsfaktor (<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
WY-14,643	Synthetischer PPARalpha Ligand

Danksagung

Vor allem möchte ich meiner großartigen Frau Hena danken, die in den vergangenen Jahren nicht nur viel Verständnis und Geduld für mein wissenschaftliches Interesse hatte, sondern auch in Berlin und Los Angeles begeistert die unterschiedlichen Lebensformen mit mir teilte, die diese Arbeit mit sich brachte.

Meinem Freund und Mentor Prof. Dr. Ronald E. Law bin ich zu unendlichem Dank verpflichtet, da er meine wissenschaftliche Arbeit weit über unsere gemeinsame Zeit in Los Angeles hinaus durch seine besonnene und herzliche Art und sein schier unerschöpfliches molekularbiologisches Wissen geprägt hat.

Meinen Freunden und Begleitern im Herzzentrum, Herrn PD. Dr. Michael Gräfe, Herrn Dr. Philipp Stawowy, Herrn Dr. Florian Blaschke und Herrn PD. Dr. Kristof Graf bin ich besonders dankbar für die Möglichkeit mit ihnen in einer Arbeitsgruppe arbeiten zu können, in der eine außergewöhnlich freundschaftliche Atmosphäre die vielen Tiefpunkte und Rückschläge überwinden und die Erfolge gemeinsam genießen ließ.

Herrn PD. Dr. Wolfgang Auch-Schwelk möchte ich danken, daß er mich während des Studiums und in den ersten Jahren als Arzt zur wissenschaftlichen Arbeit hinführte und mit den ersten gemeinsamen Projekten den Grundstock für die darauf folgende Zeit gelegt hat.

Frau Chantel Spencer-Hänsch und Frau Heike Kallisch danke ich für ihre exzellente technische Hilfe bei der Durchführung unserer Versuche, die zusammen mit ihrem unerschütterlichen Optimismus und ihrer herzerfrischenden Art jeden Weg ins Labor zu einem besonderen Ereignis werden ließen.

Mein besonderer Dank gilt schließlich Herrn Prof. Dr. Eckart Fleck, der mir zunächst als Doktorand und später als wissenschaftlicher Mitarbeiter ein unentbehrlicher Lehrer war, der meine Arbeiten kontinuierlich unterstützte und mir jederzeit mit seiner Erfahrung und seinem Rat zur Seite stand.

Eidesstattliche Erklärung

Gemäß der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang eine durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Berlin, den 26.3.2003

Dr. med. Stephan Götze